

Aus der Kinderklinik und Kinderpoliklinik im Doktor von Haunerschen Kinderspital

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. Dr. med. Christoph Klein

Der Wirkmechanismus des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin als pharmakologisches
Chaperon bei der Behandlung der Phenylketonurie

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät

der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von

Katharina Anna Schiergens, geb. Domdey

aus Gräfelfing

2017

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Ania C. Muntau

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. Eberhard Standl
Prof. Dr. med. Kai Bötzel

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. Søren W. Gersting

Dekan: Prof. Dr. med. dent. Reinhard Hickel

Tag der mündlichen Prüfung: 06.04.2017

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	7
1.1 Phenylketonurie	7
1.2 Phenylalaninhydroxylase	10
1.3 Phenylalaninarme Diät als Therapie der PKU	12
1.4 BH ₄ als pharmakologisches Chaperon	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit.....	19
2. MATERIAL UND METHODEN	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 Laborgeräte	20
2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien	20
2.1.3 Chemikalien, Reagenzien	21
2.1.4 Puffer und Lösungen	21
2.1.5 Bakterienstämme	22
2.1.6 Anzuchtmedien.....	22
2.1.7 Antibiotika	23
2.1.8 Kits zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen	23
2.1.9 Enzyme.....	23
2.1.9.1 Restriktionsendonukleasen	23
2.1.9.2 Enzymatische Abspaltung des Fusionspartners	23
2.1.9.3 Polymerase für die Polymerase-Kettenreaktion.....	23
2.1.10 Vektoren und cDNA.....	24
2.1.11 Primer für Polymerase-Kettenreaktion	24
2.1.12 Kit für DNA-Sequenzanalyse	25
2.1.13 Puffer für Restriktionsspaltungen	25
2.1.14 Reagenzien für die Gateway®-Klonierung	25
2.1.15 Software	25
2.2 Methoden.....	26
2.2.1 Molekularbiologische Methoden.....	26
2.2.1.1 Anzucht von <i>E. coli</i> -Kulturen	26
2.2.1.2 Glycerin-Dauerkulturen für die langfristige Lagerung	26
2.2.1.3 DNA-Transformation	26
2.2.1.4 Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen	27
2.2.1.4.1 Mini-Prep von Plasmid-DNA.....	27
2.2.1.4.2 Midi- und Maxi-Prep von Plasmid-DNA.....	27
2.2.1.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration.....	27
2.2.1.6 Klonierung eines Vektors für die prokaryote Expression der humanen Wildtyp-PAH und Varianten der PAH.....	27
2.2.1.6.1 Polymerase Kettenreaktion	27

2.2.1.6.2 Site-Directed Mutagenesis	28
2.2.1.6.3 Vektor pMALc2E	28
2.2.1.6.4 Vektor pMALc2X	29
2.2.1.6.5 Gateway® Vektoren	29
2.2.1.7 Restriktionsverdau mit Endonukleasen	30
2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese	31
2.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	31
2.2.1.10 Sequenzierung der Plasmide nach Sanger	31
2.2.1.11 Proteinexpression aus pMALc2E/pMALc2X und pMALc2E/X DEST-Vektoren zur Durchführung eines Expressionstests	32
2.2.1.12 Isolierung der Proteine aus <i>E.coli</i> -Zellen	33
2.2.1.13 Proteinexpression und -isolierung zur Proteinaufreinigung	33
2.2.1.14 Aufreinigung der rekombinanten MBP-PAH Fusionsproteine durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie	34
2.2.1.15 Bestimmung der Proteinkonzentration	34
2.2.1.15.1 Photometrische Bestimmung bei A_{280}	34
2.2.1.15.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	35
2.2.2 Fluoreszenzspektrophotometrische Messungen	35
2.2.2.1 Differential Scanning Fluorimetry	35
2.2.2.2 Kinetische Analyse der Denaturierung	36
2.2.2.3 Trübungsmessung	36
2.2.2.4 Statistische Auswertung	37
2.2.2.4.1 Auswertung der thermische Denaturierung	37
2.2.2.4.2 Auswertung der kinetischen Denaturierung	37
2.2.2.4.3 Auswertung der Right Angle Light Scattering Messungen	38
3. ERGEBNISSE	39
3.1 Etablierung spektrophotometrischer Methoden und Auswahl der Kofaktoren	39
3.1.1 Abhängigkeit der Übergangstemperatur des murinen PAH Wildtyps von der Geschwindigkeit der Erwärmung während der thermischen Denaturierung	39
3.1.2 Auswahl eines geeigneten PAH-Konstrukts für DSF-Messungen	41
3.1.3 Etablierung des Assays zur kinetischen Proteindenaturierung	43
3.1.4 Messung der Proteinaggregation	44
3.1.5 Auswahl der zu untersuchenden PAH-Varianten	44
3.1.6 Auswahl der Kofaktoren	45
3.1.7 Auswahl der Kofaktor-Konzentrationen	46
3.2 Analyse des Effekts des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin auf die Denaturierung humaner Wildtyp-PAH	46
3.2.1 Effekt von BH_4 auf das Entfaltungsmuster der Wildtyp-PAH im DSF-Assay	47
3.2.2 Analyse der kinetischen Denaturierung des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH_4	48
3.2.3 Berechnung der Aktivierungsenergie	49

3.3 Analyse des Effekts des natürlichen Kofaktors BH₄ auf die Denaturierung ausgewählter Varianten der humanen PAH.....	51
3.3.1 Effekt von BH ₄ auf das Entfaltungsmuster der PAH-Varianten im DSF-Assay.....	51
3.3.2 Vergleich der Hydrophobizität der PAH-Varianten im nativen Zustand	54
3.3.3 Analyse der kinetischen Denaturierung der PAH-Varianten im Komplex mit BH ₄	56
3.3.4 Berechnung der Aktivierungsenergien	59
3.4 Analyse des Einflusses von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die Denaturierung des humanen PAH-Wildtyp-Proteins	61
3.4.1 Analyse des Einflusses von BH ₂ , Sepiapterin und 6-MPH ₄ auf die thermische Stabilität des PAH-Wildtyps	62
3.4.2 Vergleich der Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH ₄ , BH ₂ , Sepiapterin und 6-MPH ₄	63
3.5 Analyse des Einflusses von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die thermische Denaturierung ausgewählter Varianten der PAH.....	65
3.5.1 Analyse des Einflusses von BH ₂ , Sepiapterin und 6-MPH ₄ auf die thermische Stabilität der PAH-Varianten.....	65
3.5.2 Vergleich der Aktivierungsenergien der PAH-Varianten im Komplex mit BH ₂ , Sepiapterin und 6-MPH ₄	70
3.6 Analyse des Effekts des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin sowie des Substrats Phenylalanin auf die Denaturierung und Aggregation des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A	71
3.6.1 Analyse des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A im DSF-Assay	71
3.6.1.1 Hydrophobizität des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A im nativen Zustand.....	71
3.6.1.2 Analyse der thermischen Entfaltungskurven des murinen PAH-Wildtyp-Proteins und seiner Variante V106A durch Zugabe von BH ₄ und Phenylalanin	72
3.6.2 Analyse des Aggregationsverhaltens des murinen PAH-Wildtyp-Proteins und seiner Variante V106A durch <i>Right Angle Light Scattering</i>	73
4. DISKUSSION	76
5. ZUSAMMENFASSUNG.....	87
6. LITERATURVERZEICHNIS.....	88
7. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	101
8. DANKSAGUNG.....	103

1. Einleitung

1.1 Phenylketonurie

Die Phenylketonurie (PKU; OMIM #261600) wird durch einen autosomal-rezessiv vererbten Defekt der Phenylalaninhydroxylase (PAH) verursacht. Mit einer Inzidenz von 1:5.062 ist sie die häufigste genetisch bedingte Störung des Aminosäurestoffwechsels in europäisch-stämmigen Populationen (Zschocke 2003; Nennstiel-Ratzel *et al.* 2010).

Bei der PKU führt eine verminderte Aktivität der PAH zu einer reduzierten bzw. fehlenden Hydroxylierung der über eiweißhaltige Nahrung aufgenommenen essentiellen Aminosäure Phenylalanin zu Tyrosin, was erhöhte Phenylalaninkonzentrationen im Blut zur Folge hat (Scriver *et al.* 1988). Gleichzeitig wird Tyrosin zur essentiellen Aminosäure, da es nicht, oder nur in sehr geringem Ausmaß, aus Phenylalanin gebildet wird (Jervis 1947).

Hervorgerufen wird die PKU durch Mutationen im *Phenylalaninhydroxylase (PAH)*-Gen, das sich auf Chromosom 12q22-q24.2 befindet (www.genecards.org). Bisher sind 957 verschiedene Mutationen bekannt (<http://www.biopku.org>, März 2016), von denen über 60% *missense* Mutationen sind, gefolgt von Deletions- (13,40 %), Splice- (10,93 %), silenten (5,64%) und *nonsense* (4,94%) Mutationen. Andere Mutationen machen nur einen geringen Prozentsatz aus (www.pahdb.mcgill.ca). Ein Großteil der betroffenen Patienten ist „*compound heterozygot*“ und trägt damit unterschiedliche Mutationen auf beiden für die *PAH* kodierenden Allele. Dies führt dazu, dass die PAH auf Proteinebene verschiedene durch die Mutationen verursachte Veränderungen zeigt, die sich gegenseitig beeinflussen können (Shen *et al.* 2016). Die genetische Heterogenität bei der PKU ist damit sehr hoch (Danecka *et al.* 2015).

Da nicht jede Mutation auf DNA-Ebene zur gleichen Schwere der Erkrankung führt, ist das klinische Erscheinungsbild der Betroffenen sehr variabel. Neugeborene mit PKU zeigen keine klinischen Auffälligkeiten, da die mütterliche Enzymaktivität intrauterin für eine normale Phenylalaninhomeostase ausreichend ist, und in der Regel werden Eltern nach der Geburt zu ihrem gesunden Kind beglückwünscht. Die Zeichen der neurologischen und körperlichen Beeinträchtigung beginnen schleichend. Auffallend ist in den ersten Monaten lediglich bei Kindern mit stark erhöhten Phenylalaninwerten im Blut ein oft als „pferdestallähnlich“ beschriebener Uringeruch (Følling 1934; Centerwall & Centerwall 2000); häufig zeigen diese Kinder auch stark juckende, ekzematöse Hautveränderungen. Aufgrund des Tyrosinmangels und des daraus folgenden Mangels an Melanin sind betroffene Kinder häufig hellhäutig, blauäugig und blond (Fitzpatrick & Miyamoto 1957; Al & Christodoulou 2015). Ab dem zweiten Lebenshalbjahr weisen die Patienten einen erhöhten Muskeltonus und gesteigerte Muskeleigenreflexe auf, was Zeichen für eine Schädigung sowohl des pyramidalen, als auch des extrapyramidal-motorischen Systems sind (MacLeod *et al.* 1983). Bleiben die Kinder weiterhin unbehandelt, entwickeln sie schwerste fortschreitende neurologische Defizite mit Intelligenzverlust, Autoaggressivität und psychomotorischer Retardierung (Corsellis 1953;

Poser & van Bogaert 1959; Belanger-Quintana *et al.* 2011). Häufig wird die Erkrankung von Autismus und Epilepsieneigung begleitet; auch psychiatrische Erkrankungen wie Depressionen und Angststörungen können mit zunehmendem Alter auftreten (Moore *et al.* 1964; Manti *et al.* 2016). Vor Einführung der diätetischen Therapie mussten die Kinder deshalb häufig in geschlossenen Therapieeinrichtungen untergebracht werden. (Woolf & Vulliamy 1951; Blau *et al.* 2010; Mitchell *et al.* 2011).

Die Phenylketonurie wurde erstmals von Asbjørn Følling beschrieben, dem bereits im Jahr 1934 der Nachweis von Phenylbrenztraubensäure (Phenylpyruvat) im Urin eines geistig retardierten Geschwisterpaares gelang. Phenylpyruvat und andere atypische Stoffwechselprodukte wie Phenyllaktat und Phenylacetat entstehen durch den fehlerhaften Abbau von Phenylalanin und werden im Urin in großen Mengen ausgeschieden. Wird einer solchen Urinprobe im Rahmen der „Fölling-Probe“ Eisen-III-Chlorid zugegeben, entsteht durch dessen Reduktion zu Eisen-II-Chlorid eine charakteristische Grünfärbung als Nachweis von Phenylpyruvat. So bezeichnete Følling das Krankheitsbild als „Imbecillitas phenylpyruvica“, zu Deutsch „Phenylbrenztraubensäure-Schwachsinn“ (Følling 1934). 13 Jahre nach Føllings Entdeckung gelang es G.A. Jervis, den der PKU zu Grunde liegenden Stoffwechseldefekt nachzuweisen, nämlich einen Defekt in der Verstoffwechslung von Phenylalanin zu Tyrosin (Jervis 1947).

1953 machte der deutsche Kinderarzt Horst Bickel die PKU zur behandelbaren genetischen Erkrankung: Er entwickelte die phenylalaninarme Diät, mit der er eine 17 Monate alte Patientin erfolgreich behandelte (Bickel *et al.* 1953).

Von besonderer Bedeutung bei der PKU ist ihre frühzeitige Behandlung vor Eintreten irreversibler Hirnschädigungen. Robert Guthrie entwickelte 1963 einen mikrobiologischen Hemmtest, den sogenannten Guthrie-Test, der ab Ende der 1960er Jahre deutschlandweit zur Früherkennung betroffener Kinder eingesetzt wurde (Guthrie & Susi 1963). Mittlerweile wurde der Guthrie-Test durch das modernere Verfahren der Tandem-Massenspektrometrie abgelöst (Chace *et al.* 1999; Harms & Olgemöller 2011). Die Tandem-Massenspektrometrie erlaubt eine verlässliche Konzentrationsbestimmung von Aminosäuren und Acylcarnitinen aus kleinen Blutvolumina. So kann nicht nur die Relation von Phenylalanin zu Tyrosin bestimmt werden, sondern im gleichen Schritt auch auf andere angeborene Stoffwechseldefekte getestet werden (Sahai & Marsden 2009; Blau *et al.* 2011).

Definitionsgemäß wird eine Phenylalaninkonzentration größer als 120 µmol/l im Blutplasma als Hyperphenylalaninämie (HPA) bezeichnet. Die Phänotypen der HPA, die durch Mutationen im *PAH*-Gen hervorgerufen werden, werden nach der prätherapeutischen Phenylalaninkonzentration im Blut klassifiziert:

Die **klassische PKU** liegt bei Phenylalaninkonzentrationen über 1.200 µmol/l vor, während die **milde PKU** durch Werte kleiner 1.200 µmol/l und größer 600 µmol/l definiert ist.

Patienten mit klassischer bzw. milder PKU benötigen eine lebenslange Behandlung, um einer mentalen Retardierung vorzubeugen. Bei Betroffenen mit **milder HPA** (Phenylalaninkonzentration im Blut kleiner 600 $\mu\text{mol/l}$ und größer 120 $\mu\text{mol/l}$) wird weltweit sehr kontrovers über die Notwendigkeit einer Therapie diskutiert (Weglage *et al.* 2001; Lagler *et al.* 2010; Camp *et al.* 2014; Jahja *et al.* 2014).

Eine weitere Erkrankung, die eine HPA zur Folge hat, ist die **atypische PKU**. Diese wird nicht durch Mutationen im *PAH*-Gen hervorgerufen, sondern durch einen genetischen Mangel des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin (BH_4) infolge verschiedener Gendefekte verursacht. Lediglich 2% aller Patienten mit PKU sind von dieser Variante betroffen.

Klinische Phänotypen	Prätherapeutische Phe-Konzentrationen im Blut	Enzymaktivität
Klassische PKU Typ I	> 1.200 $\mu\text{mol/l}$	< 1%
Milde PKU Typ II	< 1.200 $\mu\text{mol/l}$ und > 600 $\mu\text{mol/l}$	1 – 3 %
Milde HPA Typ III	< 600 $\mu\text{mol/l}$ und > 120 $\mu\text{mol/l}$	3 – 10 %
Atypische PKU (BH_4 -Mangel)	150 > 1.200 $\mu\text{mol/l}$	Normal

Tabelle 1: Klassifikation der genetisch bedingten HPA (Muntau *et al.* 2000).

Von besonderer klinischer Bedeutung ist auch die maternale PKU, die den Zeitraum der Schwangerschaft einer HPA-Patientin beschreibt. Während bei Jugendlichen und Erwachsenen mit abgeschlossener Gehirnentwicklung die strenge Einhaltung der phenylalaninarmen Diät zur Kontrolle des Phenylalaninspiegels häufig gelockert wird (s.u.), muss diese während der Schwangerschaft wieder streng eingehalten werden. Erhöhte maternale Phenylalaninkonzentrationen führen zu teratogenen Effekten. So weisen etwa 90% der Kinder unbehandelter PKU-kranker Mütter mit maternalen Phenylalaninkonzentrationen über 1.200 $\mu\text{mol/l}$ eine mentale Retardierung auf, etwa 70% sind mikrozephal (Lenke & Levy 1980). Auch intrauterine Wachstumsretardierungen und angeborene Herzfehler treten mit etwa 40% bzw. 10-12% deutlich häufiger auf als in der Normalbevölkerung (Lenke & Levy 1980; Levy 2012; Martino *et al.* 2013). Das Risiko für diese Behinderungen ist sowohl abhängig von der Phenylalaninkonzentration im mütterlichen Blut als auch vom Zeitpunkt und der Zeitdauer der Exposition gegenüber erhöhten Phenylalaninkonzentrationen (Prick *et al.* 2012; Martino *et al.* 2013). HPA-Patientinnen, die planen, schwanger zu werden und zu diesem Zeitpunkt keine Diät einhalten, sollten deshalb die phenylalaninarme Diät wieder aufnehmen, um schon einige Monate vor der gewünschten Konzeption stabile Phenylalaninwerte von 120 bis maximal 360 $\mu\text{mol/l}$ zu erreichen und diese während der Schwangerschaft zu halten (American Academy of Pediatrics 2001; Mitchell *et al.* 2011; Camp *et al.* 2014; Vockley *et al.* 2014).

1.2 Phenylalaninhydroxylase

Die Phenylalaninhydroxylase wird beim Menschen in der Leber synthetisiert und ist im Zytosol der Zelle lokalisiert. Sie gehört neben der Tyrosin- und der Tryptophanhydroxylase zur Familie der aromatischen Aminosäurehydroxylasen. Diese zählen zu den Monooxygenasen, da sie während der Hydroxylierungsreaktion ein Sauerstoffatom eines Sauerstoffmoleküls auf ihr Substrat übertragen (Kaufman *et al.* 1962). Wie alle aromatischen Aminosäurehydroxylasen benötigt die PAH Eisen und ihren natürlichen Kofaktor BH_4 , um eine Hydroxylgruppe in den aromatischen Ring ihres Substrats einzubauen. Das Eisen wird während dieser Hydroxylierungsreaktion von Fe^{3+} zu Fe^{2+} reduziert (Hegg & Que, Jr. 1997; Costas *et al.* 2004). BH_4 stellt die für die Reaktion benötigten Elektronen zur Verfügung und wird dadurch zu der quinoiden Form von Dihydrobiopterin (BH_2) oxidiert. Die Regeneration des Kofaktors erfolgt über die Dihydropteridinreduktase (DHPR) unter Anwesenheit von NADH/H^+ (s. Abb. 1). Ist DHPR nicht in ausreichendem Maß vorhanden, wird die quinoide Form von BH_4 nicht-enzymatisch in BH_2 umgewandelt, das wiederum durch eine Dihydrofolatreduktase unter Anwesenheit von NADPH/H^+ zu BH_4 reduziert werden kann (nicht abgebildet) (Werner *et al.* 2011).

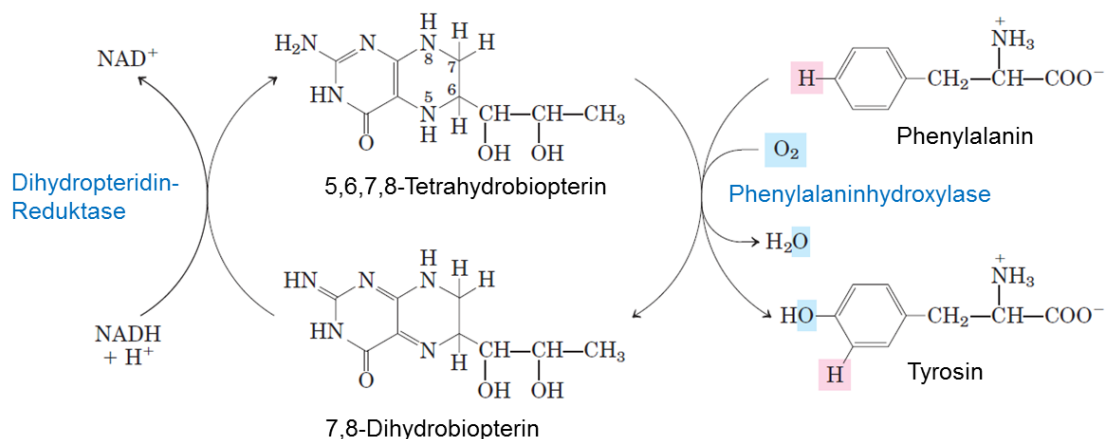


Abbildung 1: Für die Hydroxylierungsreaktion von Phenylalanin zu Tyrosin werden der natürliche Kofaktor Tetrahydrobiopterin (BH_4) und Sauerstoff benötigt. BH_4 wird dabei zu einem quinoiden Dihydrobiopterin (BH_2) oxidiert und mit Hilfe der Dihydropteridin-Reduktase in Anwesenheit von NADH/H^+ wieder zu BH_4 reduziert (Nelson DL & Cox MN 2013).

Die Hydroxylierungsreaktion der essentiellen Aminosäure Phenylalanin zu Tyrosin ist der geschwindigkeitsbestimmende Schritt des Phenylalaninstoffwechsels. Etwa 75% des über die Nahrung aufgenommenen Phenylalanins wird über diesen Weg abgebaut (Underhaug *et al.* 2012). Im weiteren Verlauf wird Tyrosin zum biogenen Amin Dopamin und dieses zu den Katecholaminen Noradrenalin und Adrenalin verstoffwechselt (Hufton *et al.* 1995; Schuck *et al.* 2015).

Die PAH von Säugetieren ist ein homotetrameres Enzym, bestehend aus einem Dimer aus Dimeren, die durch eine Tetramerisierungsregion asymmetrisch miteinander zu einem Tetramer verbunden sind (Fusetti *et al.* 1998). Jedes Monomer besitzt eine Größe von 52

kDa und besteht aus einer regulatorischen (Aminosäuren 1-142), einer katalytischen (Aminosäuren 143-410) und einer Oligomerisierungsdomäne (Aminosäuren 411-452) (Erlandsen & Stevens 1999).

Die regulatorische Domäne ist am N-Terminus des Enzyms lokalisiert. Sie ist über eine Gelenkregion („hinge-region“, Arg111–Thr117) flexibel an die katalytische Domäne gebunden, tritt aber auch mit der katalytischen Domäne des zweiten Monomers im Dimer in Kontakt. Während innerhalb eines Dimers also jede regulatorische Domäne mit beiden katalytischen Domänen interagiert, kommt es hingegen zu keiner direkten Interaktion zwischen den beiden regulatorischen Domänen (Fitzpatrick 2012). In der katalytischen Domäne befinden sich die Bindungsstellen für Eisen, den Kofaktor BH_4 und das Substrat Phenylalanin (Carluccio *et al.* 2016).

Die Oligomerisierungsdomäne enthält zu Beginn eine antiparallele β -Faltblattstruktur (Aminosäuren 411-414 und 421-424), durch welche die Bildung des Dimers möglich wird, gefolgt von einer α -Helix (Aminosäuren 428 – 452), die durch Ausbildung eines antiparallelen coiled-coil-Motivs mit der α -Helix des angrenzenden Monomers zur Bildung des Tetramers führt (Flydal & Martinez 2013).

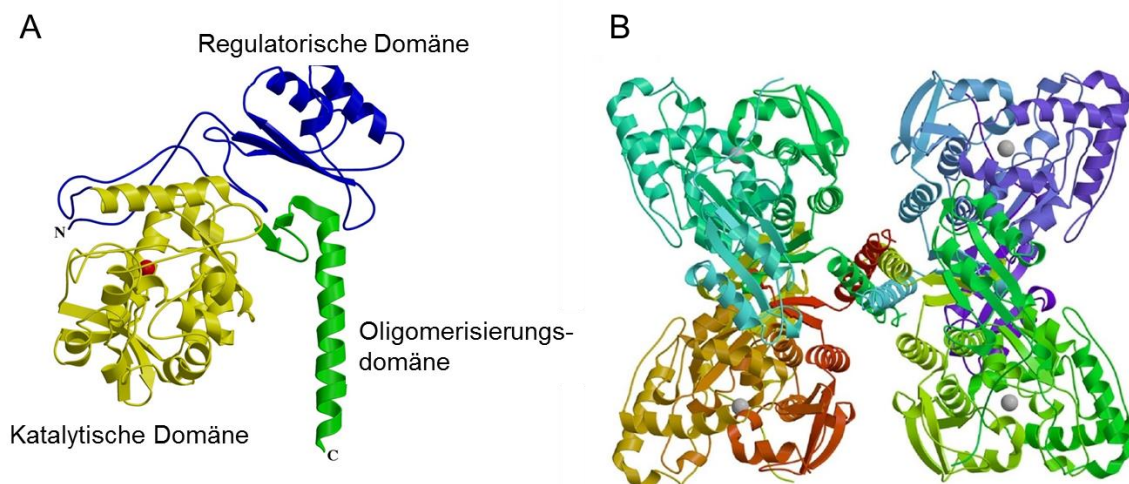


Abbildung 2: A Monomer der PAH, bestehend aus drei funktionellen Domänen: N-terminale regulatorische Domäne (blau), katalytische Domäne (gelb) mit den Bindungsstellen für Eisen (rote Kugel) sowie Phenylalanin und BH_4 (nicht abgebildet) und Oligomerisierungsdomäne (grün). B Durch Zusammenschluss von vier einzelnen Monomeren über die jeweilige Oligomerisierungsdomäne entsteht die funktionelle, tetramere PAH (Erlandsen & Stevens 1999).

Die Aktivität der PAH wird durch verschiedene Regulationsmechanismen gesteuert, wobei vor allem Phosphorylierungsreaktionen und die Bindung des natürlichen Kofaktors BH_4 sowie des Substrats Phenylalanin an die PAH eine wichtige Rolle spielen (Xia *et al.* 1994; Shiman *et al.* 1994a; Shiman *et al.* 1994b; Fitzpatrick 2012).

Durch Phosphorylierung an Position Ser16 über eine cAMP-abhängige Proteinkinase kann die Enzymaktivität um das Dreifache gesteigert werden (Abita *et al.* 1976).

Auch das Substrat Phenylalanin bewirkt bei der humanen PAH eine drei- bis sechsfache Aktivitätssteigerung (Gersting *et al.* 2008). Es wird vermutet, dass dies einer der wichtigsten Regulationsmechanismen zur Aufrechterhaltung der Phenylalaninhomöostase ist. Im Gegensatz dazu führt die Bindung des Kofaktors BH₄ bei Abwesenheit des Substrats zur Bildung eines inaktiven PAH-BH₄-Komplexes, wodurch es zur Inhibierung der Enzymaktivität kommt (Fitzpatrick 2012; Underhaug *et al.* 2012).

Die Bindung von Phenylalanin an die PAH löst konformative Veränderungen vor allem im Bereich der regulatorischen und katalytischen Domänen des Enzyms aus, die wahrscheinlich zu einer offeneren, dynamischeren Struktur der PAH und zu einer geringeren Bindungsaffinität des Kofaktors führen. BH₄ bindet in Abwesenheit des Substrats unter anderem über die N-terminale regulatorische Domäne an die PAH. Durch konformationelle Veränderungen kommt es zur oben erwähnten Inhibierung des Enzyms, die wiederum durch Substratbindung aufgehoben werden kann (Andersen *et al.* 2003; Solstad *et al.* 2003; Fitzpatrick 2012).

1.3 Phenylalaninarme Diät als Therapie der PKU

Die Einführung der phenylalaninarmen Diät durch Bickel, in Kombination mit der Früherkennung der Erkrankung durch das Neugeborenencreening, machte die PKU zum Prototyp der behandelbaren angeborenen Stoffwechselerkrankung.

Nach der Feststellung einer HPA im Neugeborenencreening müssen weitere, methodisch unabhängige Tests zur Diagnosebestätigung folgen (Camp *et al.* 2014; Vockley *et al.* 2014). Eine transiente HPA kann verschiedene Ursachen haben, zum Beispiel extreme Unreife bei Frühgeborenen, Niereninsuffizienz oder einen hohen Aminosäuregehalt der Nahrung bei parenteraler Ernährung (Cunningham 1966; Mabry 1990). Ist die persistierende HPA gesichert, muss zunächst eine atypische PKU ausgeschlossen werden. Dies erfolgt heute durch die Bestimmung der Pterine, Biopterin und Neopterin im Trockenblut und durch die Aktivitätsbestimmung der DHPR in Erythrozyten (Opladen *et al.* 2011). Die Diagnose muss durch weitere Tests bestätigt werden (Muntau *et al.* 2000; Blau *et al.* 2010; Blau *et al.* 2011; Mitchell *et al.* 2011). Erhärtet sich hingegen der Verdacht des Defekts der PAH, muss umgehend mit der diätetischen Therapie begonnen werden.

In den ersten Lebenstagen erfolgt in der Regel eine phenylalaninfreie Diät, um die meist stark erhöhten Plasmaphenylalaninkonzentrationen rasch zu senken. Da Phenylalanin jedoch zu den essentiellen Aminosäuren zählt, die nicht vom Körper synthetisiert werden können, muss sie langfristig in geringem Maß zugeführt werden. Deshalb muss im Anschluss an die phenylalaninfreie Diät die Umstellung auf eine phenylalaninarme Diät erfolgen (Flannery *et al.* 1983; Macdonald *et al.* 2006).

Während sich bei Säuglingen die spezifische Diät noch verhältnismäßig einfach gestaltet – je nach individueller Toleranz ist eine Ernährung mit bis zu 50% Muttermilch in Kombination mit phenylalaninfreier Nahrung möglich – wird diese ab Einführung von Beikost bis zur

gänzlichen Umstellung auf feste Nahrung deutlich schwieriger. Tierische Eiweiße enthalten viel Phenylalanin, sodass diese größtenteils vermieden werden müssen. Mittlerweile stehen zahlreiche phenylalaninarme Produkte aus speziellem phenylalaninarmen Mehl, sowie eiweißarme Milch und sogar eiweißarme Süßigkeiten zur Verfügung (Macdonald *et al.* 2004; van Calcar & Ney 2012) .

Aufgrund der geringen Menge an erlaubtem Phenylalanin ist die durch die phenylalaninarme Nahrung aufgenommene Menge an Eiweiß zu gering, um den täglichen Bedarf eines Kindes zu decken. Um eine normale körperliche Entwicklung zu gewährleisten, müssen Betroffene zusätzlich speziell hergestellte eiweißreiche, aber phenylalaninfreie Nahrungsergänzungsmittel zu sich nehmen. Durch diese wird auch die nötige Zufuhr von Vitaminen und Spurenelementen sichergestellt (Macdonald *et al.* 2004; Evans *et al.* 2014).

Es hat sich gezeigt, dass die Therapie der PKU durch diätetische Restriktion der Phenylalaninzufuhr eine weitestgehend normale geistige Entwicklung zur Folge hat (Smith & Wolff 1974). In den Anfangszeiten der diätetischen PKU-Therapie wurde die Behandlung zwischen dem 6. bis 8. Lebensjahr unter der Annahme beendet, dass zu diesem Zeitpunkt die Entwicklung des Gehirns größtenteils abgeschlossen ist und somit die toxischen Abbauprodukte des Phenylalanins keine bleibenden Beeinträchtigungen hervorrufen.

Schon bald wurde jedoch festgestellt, dass nach Beendigung der diätetischen Therapie nicht nur Ekzeme der Haut gehäuft auftreten, sondern vor allem auch neurologische und psychiatrische Probleme (Potocnik & Widhalm 1994; Koch *et al.* 2002). Tiefergehende neurologische Untersuchungen von erwachsenen PKU-Patienten zeigten Konzentrationsschwächen, eine verlangsamte kognitive Aufnahme und Verarbeitung von Informationen, eine geringere Merkfähigkeit sowie Tremor und gesteigerte Muskeleigenreflexe, die nach Beendigung der Diät deutlich schwerwiegender ausfallen als unter Diät (Pietz *et al.* 1998; Gassio *et al.* 2003; Moyle *et al.* 2007a; Moyle *et al.* 2007b; Enns *et al.* 2010). Patienten mit PKU neigen außerdem zu Depressionen, Angststörungen, Phobien, sozialer Isolation sowie einem geringen Selbstbewusstsein (Smith & Knowles 2000; Enns *et al.* 2010; Manti *et al.* 2016). Es konnte gezeigt werden, dass es zu einer Verbesserung der Lebensqualität kommt, sobald die Patienten ihre phenylalaninarme Diät wieder aufnehmen (Gassio *et al.* 2003; Bik-Multanowski *et al.* 2008).

Der IQ-Wert der Patienten, wie auch weitere Ergebnisse neurokognitiver Testungen korreliert negativ mit dem bis zum Zeitpunkt der Untersuchung erreichten kumulativen Lebenszeit-Phenylalaninkonzentration, was die Bedeutung der strengen Einhaltung der empfohlenen Phenylalaningrenzwerte betont (Azen *et al.* 1991; Brumm *et al.* 2004; Waisbren *et al.* 2007; Gonzalez *et al.* 2011). MRT-Untersuchungen des Gehirns von behandelten und unbehandelten PKU-Patienten zeigen Veränderungen sowohl der weißen, als auch der grauen Substanz des Gehirns (Pearsen *et al.* 1990; Bick *et al.* 1991; Cleary *et al.* 1994; Koch *et al.* 2002; Christ *et al.* 2016). In Zusammenschau zahlreicher Untersuchungen konnte festgestellt werden, dass sich die Veränderungen der weißen Substanz, die bei

unbehandelten PKU-Patienten auftreten, deutlich von den Veränderungen behandelter Patienten unterscheiden. Bei unbehandelten Patienten werden die Auffälligkeiten im MRT durch eine periventrikuläre Demyelinisierung hervorgerufen, während sie bei behandelten Patienten durch intramyeline Ödeme verursacht und von der aktuellen Phenylalaninkonzentration abhängig sind (Anderson & Leuzzi 2010). So konnte auch gezeigt werden, dass letztere Veränderungen durch eine Rückkehr zur strikten phenylalaninarmen Diät reversibel sind (Thompson *et al.* 1993; Cleary *et al.* 1995; Anderson & Leuzzi 2010). Aufgrund dieser Ergebnisse wird heute eine lebenslange Einhaltung der phenylalaninarmen Ernährung dringend empfohlen (Vockley *et al.* 2014).

Durch die diätetische Therapie der PKU konnte erreicht werden, dass die Patienten durchschnittliche Intelligenzquotienten erzielen und somit nicht geistig retardiert sind. Allerdings birgt die Therapie auch diverse Risiken. Obwohl sich die Qualität der spezifischen Nahrungsergänzungsmittel in den letzten Jahren deutlich verbessert hat, kann es durch die strenge Diät zu Mangelerscheinungen kommen. So werden bei Patienten immer wieder Mängel an wichtigen Spurenelementen wie Zink, Calcium, Eisen und den Vitaminen D und B12 festgestellt (Belanger-Quintana *et al.* 2011), die zu Wachstumsverzögerungen und frühzeitiger Osteoporose führen können (Barat *et al.* 2002; Modan-Moses *et al.* 2007; Porta *et al.* 2011; Thiele *et al.* 2015).

Auch bei lebenslanger Durchführung der Diät kommt es zu den oben bereits erwähnten neurologischen, psychiatrischen und motorischen Beeinträchtigungen, wenn auch in deutlich geringerem Ausmaß (Enns *et al.* 2010; Bilder *et al.* 2013). Besonderen Einfluss hat die Erkrankung auf die Konzentrationsfähigkeit, die Geschwindigkeit der Informationsverarbeitung und die Feinmotorik, da auch diätetisch behandelte PKU-Patienten in Studien hier signifikant schlechter abschneiden als die gesunde Normalbevölkerung (Pietz *et al.* 1998; Gassio *et al.* 2005a; Gassio *et al.* 2005b; Anderson *et al.* 2007; Enns *et al.* 2010; de Sonnevile *et al.* 2011). Darüber hinaus wurde ein direkter Zusammenhang zwischen erhöhten Blutphenylalaninkonzentrationen und negativer Stimmung beobachtet (Ten Hoedt *et al.* 2011; Sharman *et al.* 2012). Dennoch entstehen die psychiatrischen Symptome, die bei der PKU gehäuft auftreten, wahrscheinlich aus einem Zusammenspiel sowohl der metabolischen Störung als auch aus der enormen Belastung, die die PKU als chronische Erkrankung mit sich bringt (Brumm *et al.* 2010; Manti *et al.* 2016).

Die strenge Diät, die mit hohen Kosten für die phenylalaninfreien Nahrungsergänzungsmittel und phenylalaninarmen Nahrungsmittel verbunden ist, stellt außerdem eine große finanzielle Belastung für betroffene Familien dar (Guest *et al.* 2013; Eijgelshoven *et al.* 2013). Die bisher erhältlichen Aminosäuremischungen schmecken trotz großer Anstrengungen der industriellen Hersteller aufgrund des Vorliegens der einzelnen Aminosäuren in freier anstatt in gebundener Form sehr unangenehm und betroffene Kinder leiden darunter, täglich die benötigte Menge zu sich nehmen zu müssen (Walter *et al.* 2002). Gerade älteren Kindern

und Jugendlichen fällt es sehr schwer, sich an die strenge Diät zu halten, bedeutet diese eben auch, nicht das gleiche wie Familie und Freunde essen zu dürfen und ungewollt immer eine Sonderrolle einnehmen zu müssen. Vielen ist es unangenehm, andere Nahrungsmittel essen zu müssen als ihre Mitschüler und Freunde und ziehen es daher vor, alleine zu essen oder verzichten sogar auf ihre Nahrungsaufnahme (Gokmen *et al.* 2013a). Deshalb überrascht es nicht, dass gerade bei älteren Kindern und Jugendlichen die Adhärenz häufig niedrig ist (Walter & White 2004; Macdonald *et al.* 2010). Welch extreme emotionale Belastung die Diät für Betroffene darstellen muss, zeigt nicht zuletzt die erhöhte Rate an schweren Depressionen von jugendlichen PKU-Patienten im Vergleich zur Normalbevölkerung (Sullivan & Chang 1999; Brumm *et al.* 2010; Sharman *et al.* 2012).

Dies generiert daher ein neues Problem: Wird die Therapie mit Erreichen des Jugendalters abgebrochen, haben die Patienten ein schlechteres neurologisches Outcome und zeigen psychiatrische Auffälligkeiten. Wird sie fortgeführt, tragen die Patienten die Bürde der chronischen Erkrankung, die Risiken der Mangelernährung und müssen eine strenge Diät einhalten, durch die sie sich häufig sozial isoliert fühlen. Nachdem vor allem der mentale Gesundheitszustand der behandelten Patienten nachweislich deutlich besser ist als der der unbehandelten, ist die Empfehlung der lebenslangen Therapie gerechtfertigt (Waisbren *et al.* 2007; Camp *et al.* 2014; Vockley *et al.* 2014). Eine Alternative zur lebenslangen Diät könnte die große Belastung der betroffenen Patienten mildern.

1.4 BH₄ als pharmakologisches Chaperon

Um ihre volle Funktion zu erreichen, müssen Proteine von der linearen Primärstruktur ausgehend zur dreidimensionalen Tertiär- bzw. Quartärstruktur gefaltet werden. Obwohl die Information für die finale Struktur bereits in der Aminosäuresequenz kodiert ist, behindern die Bedingungen innerhalb einer Zelle häufig die korrekte und effektive Proteinfaltung. Deshalb steht den Zellen ein komplexes Netzwerk aus molekularen Chaperonen zur Verfügung, die eine korrekte Proteinfaltung unterstützen und eine fehlerhafte Faltung und Aggregation der Proteine verhindern (Hartl *et al.* 2011; Muntau *et al.* 2014). Gerade die Faltung von größeren Proteinen, die aus mehreren Domänen bestehen, ist sehr fehleranfällig. Molekulare Chaperone, bei denen es sich selbst um Proteine oder um sogenannte „*small molecules*“ handelt, verhindern die Aggregation von Proteinketten während des Faltungsvorgangs, indem sie die Aminosäureketten, bis die Faltung abgeschlossen ist, nach außen hin abschirmen (Hartl & Hayer-Hartl 2002).

Doch nicht nur die richtige Faltung vieler neu synthetisierter Proteine ist von Chaperonen abhängig. Chaperone können auch Entfaltungen von Proteinen verhindern, die durch Stresssituationen – wie Veränderungen der Umweltbedingungen der Zelle durch Temperaturschwankungen oder Alterungsprozesse – ausgelöst werden. So werden in Stresssituationen zum Beispiel durch sogenannte Hitzeschocktranskriptionsfaktoren nahezu

sofort Gene abgelesen, die für Chaperone bzw. Hitzeschockproteine kodieren, um die Zellhomöostase aufrecht zu erhalten (Leandro & Gomes 2008; Broadley & Hartl 2009).

In den letzten Jahren haben Fortschritte auf dem Gebiet der funktionellen Genomik und Proteomik zu der Erkenntnis geführt, dass der molekulare Mechanismus der Proteinfehlfaltung für zahlreiche genetisch bedingte Erkrankungen verantwortlich ist. Bei diesen Erkrankungen kommt es durch eine Genmutation zu einer fehlerhaften Abfolge der Aminosäuresequenzen, so dass der Code für die spätere Tertiär- oder Quartärstruktur des Proteins nicht korrekt ist. Es resultiert ein Funktionsverlust der Proteine („*loss-of-function*“) der durch zwei unterschiedliche Mechanismen ausgelöst werden kann: Eine Mutation führt zu einem frühen Stopcodon, sodass das Protein bereits primär nicht gebildet werden kann. Andererseits können *missense* Mutationen zu einer geringeren Stabilität der Tertiärstruktur der Proteine führen, so dass sich diese in Stresssituationen vermehrt entfalten und frühzeitig abgebaut werden (Waters 2001). In beiden Fällen können die Proteine ihre gewünschte Funktion nicht ausüben.

In den letzten Jahren konnte für verschiedene Erkrankungen gezeigt werden, dass diese *missense* Mutationen zu Fehlfaltung der betroffenen Proteine führen (Long *et al.* 2015; Zhang *et al.* 2015; Sahni *et al.* 2015). Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass dies auch für die PKU gilt: *missense* Mutationen führen zu einer globalen Veränderung der Proteinstruktur, wodurch die Enzymfunktion maßgeblich beeinträchtigt ist (Gersting *et al.* 2008). Diese Proteinfaltungserkrankungen müssen pathophysiologisch von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer oder Morbus Parkinson abgegrenzt werden, bei denen die Proteinfehlfaltung zur Bildung toxischer Aggregate führt (Cortez & Sim 2014; Perri *et al.* 2015). Die Erkenntnisse zum molekularen Phänotyp von Proteinfaltungserkrankungen haben zu neuartigen Strategien der Therapieentwicklung geführt. Nachdem man sich schon seit geraumer Zeit über die Bedeutung von Chaperonen bei der Proteinfaltung bewusst ist, spielt der Einsatz pharmakologischer Chaperone eine zunehmende Rolle bei der Therapieentwicklung und letztendlich der Behandlung von Proteinfaltungserkrankungen. Die Besonderheit der pharmakologischen Chaperone liegt in ihrer Eigenschaft, spezifisch an ungefaltete Proteine binden und deren Faltung in die richtige Tertiärstruktur unterstützen zu können, wodurch es zu einer Stabilisierung des Zielproteins kommt.

In dieser Arbeit soll untersucht werden, ob auch BH₄, das bereits mit großem Erfolg bei einer solchen *loss-of-function* Proteinfaltungserkrankung eingesetzt wird, als pharmakologisches Chaperon wirkt. BH₄ ist ein essentieller Kofaktor verschiedener Enzyme, die im menschlichen Stoffwechsel eine große Rolle spielen. Dazu zählen beispielsweise die Acylglycerolmonooxygenasen, die NO-Synthasen und die aromatischen Aminosäureoxygenasen, zu denen auch die PAH gehört (Ichinose *et al.* 2008).

Im Jahr 1974 wurde eine bis dato unbekannte Form der PKU beschrieben: die oben bereits erwähnte atypische PKU als Folge eines BH₄-Mangels. Da BH₄ auch Kofaktor der Tryptophan- und Tyrosinhydroxylase ist, treten aufgrund des resultierenden Neurotransmittermangels bei dieser Form der PKU trotz phenylalaninärmer Diät neurologische Symptome auf. Um dies zu verhindern, werden seit den 1980er Jahren Tetrahydrobiopterin-Belastungstests durchgeführt, um Betroffene mit atypischer PKU zu identifizieren und rechtzeitig behandeln zu können. Hierbei ist eine signifikante Senkung der Phenylalaninkonzentration nach Gabe einer Einzeldosis BH₄ in einer Konzentration von 20 mg/kg Körpergewicht ein Indikator für das Vorliegen eines BH₄-Mangels.

Im Jahr 1999 machten Kure et al. eine Zufallsentdeckung: Bei vier Patienten mit Mutationen im *PAH*-Gen ohne BH₄-Mangel senkten pharmakologische Dosen (20 mg/kg) des natürlichen Kofaktors BH₄ die Phenylalaninkonzentration im Blut (Kure et al. 1999).

Muntau et al. konnten im Jahr 2002 zeigen, dass BH₄ bei der Mehrzahl von PKU-Patienten mit mildem Phänotyp die PAH-Enzymaktivität *in vivo* steigert. Als Folge dessen sinkt unter BH₄-Therapie bei diesen Patienten die Phe-Konzentration im Blut bei erhöhter Eiweißtoleranz (Muntau et al. 2002). In den folgenden Jahren wurde bei etwa 40% der PKU-Patienten eine solche BH₄-responsive PKU diagnostiziert (Underhaug et al. 2012). Dabei hat sich herausgestellt, dass Patienten mit milder PKU oder milder HPA häufiger eine BH₄-Sensitivität zeigen als Patienten mit klassischer PKU (Fiege & Blau 2007).

Nachdem in klinischen Studien sowohl Wirksamkeit als auch Sicherheit von BH₄ bestätigt wurden (Levy et al. 2007b; Trefz et al. 2009; Sanford & Keating 2009) wurde Sapropterindihydrochlorid (die synthetische Form des Kofaktors BH₄) im Jahr 2007 in den USA und 2008 in Europa zur Therapie der BH₄-responsiven PKU zugelassen. Eine PKU gilt in der Regel dann als BH₄-responsiv, wenn es zu einer Reduktion von mindestens 30% des Phenylalaninwerts im Blut kommt. Doch auch schon geringere Reduktionen der Phenylalaninkonzentration von 20-30% können von klinischer und therapeutischer Relevanz sein (Levy et al. 2007a; Belanger-Quintana et al. 2011). Da nicht alle PKU-Patienten von einer BH₄-Therapie profitieren, müssen die Patienten sorgfältig auf ihre BH₄-Sensitivität getestet werden, bevor mit der Therapie begonnen wird. Hierzu wird ein BH₄-Belastungstest über 24 - 72 Stunden durchgeführt (Blau et al. 2010). Der Patient erhält dazu 10 - 20 mg/ kg Körpergewicht BH₄, im Anschluss werden die Phenylalaninkonzentrationen im Trockenblut in regelmäßigen Abständen kontrolliert. Bei positivem Ergebnis, also einem Abfall der Blutphenylalaninkonzentration von mehr als 30%, erfolgt ein mehrwöchiger Therapieversuch.

Die klinischen Studien zur Zulassung von Sapropterindihydrochlorid in Europa schlossen PKU-Patienten unter vier Jahren zunächst aus. In den USA ist Kuvan® für alle Altersgruppen durch die FDA zugelassen. Eine Studie von Burton et al. (Burton et al. 2011) in den USA zeigte, dass BH₄ auch bei Patienten unter vier Jahren sicher angewendet werden und die Phenylalanintoleranz deutlich steigern kann (Cunningham et al. 2012).

In Europa wird derzeit eine internationale europäische Zulassungsstudie (**Safety Pediatric Efficacy Pharmacokinetic with Kuvan**; SPARK-Studie) zum Nachweis der Wirksamkeit und Sicherheit von Sapropterindihydrochlorid bei Kindern von null bis vier Jahren durchgeführt (<http://clinicaltrials.gov>). Aufgrund der überzeugenden Daten dieser Studie erhielt Kuvan® im Juli 2015 auch in Europa für Kinder unter 4 Jahren die Zulassung (<http://www.ema.europa.eu>).

Eine weitere Patientengruppe, die ebenso von der Therapie mit BH₄ profitiert, sind schwangere PKU-Patientinnen, die schon länger keine Diät mehr durchgeführt haben oder, im Fall einer milden HPA, noch nie eine Diät durchführen mussten. Ausführliche Studien zur BH₄-Therapie während der Schwangerschaft gibt es bisher nicht. Tierversuche an trächtigen Ratten und Hasen, die mit der drei- bis zehnfach erhöhten maximalen Tagesdosis (bezogen auf Körperoberfläche) mit Sapropterindihydrochlorid behandelt wurden, zeigten keine teratogenen Effekte. Bei den Hasen wurde allerdings eine leicht erhöhte Rate an Holoprosenzephalie festgestellt (<http://www.drugs.com/pro/kuvan.html>). Die teratogenen Effekte, die durch einen erhöhten Phenylalaninspiegel während der Schwangerschaft ausgelöst werden, scheinen dieses Risiko jedoch deutlich zu übertreffen. In den USA und in Europa gab es bereits einige unkomplizierte Schwangerschaften unter phenylalanin armer Diät und Kuvan®-Therapie, aus denen gesunde Kinder hervorgegangen sind (Grange *et al.* 2014; Feillet *et al.* 2014; Trefz *et al.* 2015). Dennoch ist Sapropterindihydrochlorid bisher nur dann in der Schwangerschaft zugelassen, wenn durch eine Diät nicht die für die Schwangerschaft angestrebten therapeutischen Phenylalaninkonzentrationen erreicht werden können.

Nachdem die Therapie mit Sapropterindihydrochlorid bei BH₄-responsiven Patienten nicht nur die Phenylalaninkonzentration im Blut senkt und auf stabilem Niveau hält, sondern einige Patienten ihre phenylalaninarme Diät lockern oder sogar einstellen können (Ziesch *et al.* 2012; Keil *et al.* 2013), wurde eine deutliche Verbesserung der Lebensqualität durch BH₄-Therapie postuliert. Studien (Ziesch *et al.* 2012; Keil *et al.* 2013), Fallberichte (Gokmen *et al.* 2013b), sowie persönliche Berichte von BH₄-responsiven Patienten (z.B. unter <http://www.kuvan.com/patients/parent-caregivers-patient-stories.html>) bestätigen eine positive Auswirkung der neuen Behandlungsmöglichkeit auf die Lebensqualität der PKU-Patienten. Außerdem wurde festgestellt, dass sich die Diätadhärenz durch die Einführung der BH₄-Therapie deutlich verbessert hat (Keil *et al.* 2013). Zwei Studien (Ziesch *et al.* 2012; Demirdas *et al.* 2013) konnten jedoch keine signifikante Verbesserung der Lebensqualität der Patienten nach Einführung der Therapie feststellen, was jedoch verschiedene Gründe haben kann: Einerseits fiel im Rahmen dieser Studien auf, dass die schon vor Beginn der Therapie durchgeführten Tests zur gesundheitsassoziierten Lebensqualität bei den Patienten im Durchschnitt eine bessere Lebensqualität zeigten als bei der Normalbevölkerung. Dies könnte am gesteigerten Bewusstsein für die eigene Gesundheit bei chronisch kranken Patienten liegen. Bei einer überdurchschnittlich guten Ausgangsqualität fallen weitere

Verbesserungen der Lebensumstände weniger ins Gewicht. Darüber hinaus wurde bei den Untersuchungen kein PKU-spezifischer Fragebogen zur Beurteilung der Lebensqualität verwendet, da ein solcher noch nicht verfügbar ist. Eventuelle Verbesserungen, die zum Beispiel eine Lockerung der Diät mit sich bringen, wurden so nicht (Demirdas *et al.* 2013) oder nur in Einzelfragen, die nicht in das Testergebnis eingingen (Ziesch *et al.* 2012), bewertet.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Sapropterindichlorid, die synthetische Form des natürlichen Kofaktors BH₄, wird seit einigen Jahren in der Therapie der BH₄-sensitiven PKU angewandt. Allerdings war bei Zulassung von Kuvan[®] lediglich bekannt, dass BH₄ die Phenylalaninkonzentration von BH₄-sensitiven PKU-Patienten senkt und die Oxidation von Phenylalanin *in vivo* steigert (Muntau *et al.* 2002); der genaue Wirkmechanismus des Medikaments war zu Beginn dieser Forschungsarbeit nicht verstanden.

Das übergeordnete Ziel dieser Doktorarbeit bestand darin, das Verständnis der molekularen Mechanismen, die der Wirkung des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin als pharmakologisches Chaperon zugrunde liegen, weiter zu vertiefen.

Hierzu sollten drei Teilziele verfolgt werden.

1. Die thermische Stabilität und die Bildung löslicher Proteinaggregate sind zentrale pathophysiologische Parameter bei *missense*-induziertem Funktionsverlust varianter PAH-Proteine. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten daher das Verfahren der ANS-Fluoreszenzspektroskopie und des *right angle light scattering* weiter entwickelt werden, um den Einfluss des natürlichen Kofaktors BH₄ auf die thermische und kinetische Proteindenaturierung sowie auf die Proteinaggregation am PAH-Wildtypprotein und an varianten Proteinen zu untersuchen.
2. Zum besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehung von BH₄ sollte der Effekt dreier Derivate des natürlichen Kofaktors auf das PAH-Wildtypprotein und auf drei variante PAH-Proteine eingehend untersucht werden. Hierzu kamen das oxidierte BH₄-Analogon BH₂, die Vorstufe Sepiapterin und der synthetische Kofaktor 6-MPH₄ zum Einsatz. Da sich die Substanzen in Bezug auf das Pteridingerüst und auf die Seitenkette von BH₄ unterscheiden, sollten diese Experimente dazu beitragen, herauszuarbeiten, welche Molekülstruktur die stabilisierende Wirkung auf das PAH-Protein ausübt. Auf dieser Grundlage könnte ein verbessertes Molekül für die maßgeschneiderte Therapie von PKU-Patienten entwickelt werden.
3. In Zusammenarbeit mit anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppe sollte der Nachweis erbracht werden, dass das mutagenisierte Mausmodell *Pah^{enu1}* mit milder Phenylketonurie zur Analyse der Wirkung des pharmakologischen Chaperons BH₄ auf die PAH geeignet ist und sich die Beobachtungen am murinen Protein auf das humane PAH-Protein übertragen lassen.

2. Material und Methoden

Alle experimentellen Arbeiten wurden im Forschungszentrum des Dr. von Haunerschen Kinderspitals der Ludwig-Maximilians-Universität in München durchgeführt.

2.1 Material

2.1.1 Laborgeräte

Gerät	Markenname	Hersteller
Aufreinigungssystem	ÄKTExpress	GE Healthcare (D)
Chromatographiesäule	HiLoad 16/60 Superdex 200 column	GE Healthcare (D)
Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät	FLUOStar Optima	BMG Labtech GmbH (D)
Fluoreszenz-Mikroplatten-Lesegerät	LUMISar Optima	BMG Labtech GmbH (D)
Fluoreszenz-Spektrophotometer	CARY Eclipse	Varian, Agilent Technologies (USA)
Küvettenhalter	Peltier-Thermostatted Multicell Holder	Varian, Agilent Technologies (USA)
Küvetenschleuder	KS 8 CE	ITS (D)
Laborschüttler	Vortex-Genie VF2	Bender & Hobein AG (CH) IKA Labortechnik (D)
Magnetrührer	Variomag Monotherm Ikamag RCT	Thermo Scientific (USA) IKA Labortechnik (D)
pH-Meter	qpH 70	VWR International (USA)
Präzisionswaage	Sartorius Extend	Sartorius (D)
Schüttelinkubator	Excella E24 Incubator Shaker System	New Brunswick Scientific, Eppendorf (D)
Sonifiziergerät	Branson Digital Cell Disruptor	Branson, Emerson Industrial Automation (USA)
Spektrophotometer	Ultrospec 1000 UV/ Visible Spectrophotometer	Pharmacia Biotech (USA)
	Nano Drop ND 1000	Thermo Scientific (USA)
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf (D)

2.1.2 Allgemeine Verbrauchsmaterialien

Name	Eigenschaft	Bezugsquelle
Fluoreszenz-Küvetten	16.100-F/Q/10/Z20 6	STARNA (D)
Küvettenreiniger	Hellmanex II	Hellma Analytics (D)
Petrischalen	92 x 16 mm ohne Nocken	Sarstedt (D)

Pipettenspitzen	5 µl, 10 µl, 100 µl, 1000 µl Biosphere Filter Tips	Gilson (USA) Eppendorf (D) Sarstedt (D)
Pipettierhilfen	Eppendorf research Gilson Pipetman Neo	Eppendorf (D) Gilson (USA)
Reaktionsgefäße	Safe Seal	Sarstedt (D)
Zentrifugenröhrchen	15 ml 50 ml Corning CentriStar	Sarstedt (D) Corning (USA)

2.1.3 Chemikalien, Reagenzien

Alle Lösungen wurden, sofern nicht anders angegeben, mit deionisiertem Wasser hergestellt und bei Bedarf autoklaviert oder steril filtriert.

Name	Bezugsquelle
1 kb DNA ladder	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
6-Methyltetrahydropterin (6-MPH₄)	Schircks Laboratories (CH)
8-anilino-1-naphtalensulfonsäure (ANS)	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Aqua ad iniectabilia	B. Braun Melsungen (D)
Coomassie Brilliant Blue	SERVA Electrophoresis GmbH (D)
Dihydrobiopterin (BH₂)	Schircks Laboratories (CH)
Dithiothreitol (DTT)	Fluka, Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Eisenammoniumsulfat	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Ethanol in aqua dest.	Apotheke der Universität München (D)
Ethidiumbromid	Carl Roth GmbH (D)
Flüssiger Stickstoff	Linde AG (D)
Gel Loading Solution	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)
Isopropanol	Apotheke der Universität München (D)
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Thermo Scientific Inc. (USA), ehem. Fermentas
Kaliumchlorid	Merck (D)
LE Agarose	Biozym Scientific GmbH (D)
Magnesiumchlorid	Merck (D)
Magnesiumsulfat	Merck (D)
Natriumchlorid	Merck (D)
Salzsäure	Merck (D)
Tetrahydrobiopterin (BH₄)	Schircks Laboratories (CH)

2.1.4 Puffer und Lösungen

Die allgemein gebräuchlichen Puffer wurden mit H₂O bidest. aus der Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU hergestellt und im Anschluss gefiltert und entgast.

Puffer	Zusammensetzung	Kommentar
HEPES-Puffer	20 mM HEPES 200 mM NaCl	pH 7,0
Lysepuffer	1 mM DTT 1 mM EDTA 20 mM TRIS	pH 8,0
TE-Puffer	10 mM TRIS 1 mM EDTA	pH 8,0
TBS-Puffer	20 mM TRIS 140 mM NaCl	pH 7,5
TBE-Puffer	90 mM TRIS 90 mM Borsäure 2 mM EDTA	pH 8,0

2.1.5 Bakterienstämme

Name	Bezugsquelle	Kommentar
DH5α™ Competent Cells Subcloning Efficiency™	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)	E.coli Ca ²⁺ kompetent
One Shot ccdB Survival T1 Phage-Resistant Cells	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)	E.coli ccdB-resistent für Gateway®-Produkte

2.1.6 Anzuchtmedien

Die allgemein gebräuchlichen Medien wurden mit H₂O bidest., das aus der Apotheke Klinikum Innenstadt der LMU bezogen wurde, hergestellt und im Anschluss bei 120°C 20 Minuten autoklaviert.

Medium	Zusammensetzung	Kommentar
LB-Medium	Hefeextrakt 0,5 % Trypton 1 % NaCl 0,5 - 1 %	in H ₂ O bidest. autoklavieren pH 7,4
LB Agar-Platten	LB-Medium 2 % Agar	20 Minuten Inkubation
Selektive LB Agar-Platten	LB-Medium 2 % Agar Antibiotikum (s. 2.1.7)	Zugabe von Antibiotikum nach abkühlen auf 50°C 20 Minuten Inkubation
SOC-Medium	Hefeextrakt 0,5 % Trypton 2 % 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10mM MgCl, 10 mM MgSO ₄	in H ₂ O bidest. autoklavieren Zugabe von 20 mM Glukose

2.1.7 Antibiotika

Antibiotikum	Bezugsquelle
Ampicillin	SERVA Electrophoresis GmbH (D)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich Co. LLC. (D)

2.1.8 Kits zur Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen

Kit	Bezugsquelle
QIAprepSpin Miniprep	Qiagen, Hilden (D)
QIAfilter Plasmid Midi	Qiagen, Hilden (D)
QIAfilter Plasmid Maxi	Qiagen, Hilden (D)

2.1.9 Enzyme

2.1.9.1 Restriktionsendonukleasen

Enzym	Schneidesequenz	Bezugsquelle
EcoRI	5'...G↓A A T T C...3' 3'...C T T A A↑G...5'	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas
HindIII/ HincII	5'...G T Y↓R A C...3' 3'...C A R↑Y T G...5'	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas
HpaI/ KspAI	5'...G T T↓A A C...3' 3'...C A A↑T T G...5'	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas
NdeI	5'...C A↓T A T G...3' 3'...G T A T↑A C...5'	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas
NotI	5'...G C↓G G C C G C...3' 3'...C G C C G G↑C G...5'	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas

2.1.9.2 Enzymatische Abspaltung des Fusionspartners

Um das zur Proteinaufreinigung benötigte maltosebindende Protein (MBP) von der PAH zu trennen, wurden vektorabhängig zwei unterschiedliche Enzyme verwendet.

Enzym	Vektor	Schneidesequenz	Bezugsquelle
Enterokinase	pMALc2E pMALc2E DEST	Asp-Asp-Asp-Asp-Lys↓	AG Muntau, LMU (D)
Faktor Xa	pMALc2X pMALc2X DEST	Ile-(Glu/Asp)-Gly-Arg↓	AG Muntau, LMU (D)

2.1.9.3 Polymerase für die Polymerase-Kettenreaktion

Zur Durchführung der PCR-Amplifikation von Genen wurde die *Pfu*-Polymerase von Thermo Scientific Inc., USA, ehem. Fermentas, verwendet, die eine hohe Hitzestabilität und

Replikationsgenauigkeit verspricht. Als Puffer wurde der Pfu-Puffer von Thermo Scientific Inc. verwendet.

2.1.10 Vektoren und cDNA

Name	Codiertes Protein Bemerkung	Bezugsquelle
pcDNA3.1/<i>myc</i>-His C Vektor	Vektor mit Ampicillin- und Neomycin-Resistenzgen	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
pDONRTM 221 Gateway[®]-Vektor	Donorvektor, beinhaltet <i>attP</i> -sites	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
pENTRTM Gateway[®]-Vektor	Expressionsvektor, beinhaltet <i>attL</i> -sites	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
pMALc2E Expressionsvektor	MBP Enterokinase-Schnittstelle	New England Biolabs (USA)
pMALc2X Expressionsvektor	MBP Faktor Xa Schnittstelle	New England Biolabs (USA)
cDNA humane Wt-PAH	Humane Phenylalaninhydroxylase	imaGenes (D)
cDNA murine Wt-PAH	Murine Phenylalaninhydroxylase	imaGenes (D)

2.1.11 Primer für Polymerase-Kettenreaktion

Primer	Konstrukt	Sequenz
PAH forward	PAH in cDNA 3.1	5'- GGG GAC AAG TTT GTA CAA AAA AGC AGG CTG CAT GTC CAC TGC GGT CC – 3'
PAH reverse	PAH in cDNA 3.1	5'- GGG GAC CAC TTT GTA CAA GAA AGC TGG GTC TTA CTT TAT TTT CTG GAG GGC AC – 3'
M13 u	Entry Clone	5' – GTA AAA CGA CGG CCA GTG – 3'
M13 r	Entry Clone	5' – GGA AAC AGC TAT GAC CAT G – 3'
pMal forward	Expression Clone	5' – CGT CAG ACT GTC GAT GAA GC – 3'
pMal reverse	Expression Clone	5'- CGC CAG GGT TTT CCC AGT CAC GAC – 3'

2.1.12 Kit für DNA-Sequenzanalyse

Für die DNA-Sequenzanalyse wurde das BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Life Technologies GmbH Invitrogen, Deutschland, verwendet.

2.1.13 Puffer für Restriktionsspaltungen

Die Wahl des jeweiligen Puffers erfolgte in Abhängigkeit der gewählten Restriktionsendonukleasen nach Empfehlungen des Herstellers.

Puffer	Bezugsquelle
Buffer EcoR I	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas
Buffer Orange	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas
Buffer Tango 2 x	Thermo Scientific Inc. (USA) ehem. Fermentas

2.1.14 Reagenzien für die Gateway®-Klonierung

Die für die Gateway-Klonierung verwendeten Vektoren und Bakterienstämme sind unter 2.1.10 bzw. 2.1.5 aufgelistet.

Enzym/ Puffer	Reaktion	Bezugsquelle
BP Clonase™ II	BP-Reaktion <i>attB</i> x <i>attP</i> -> <i>attL</i> x <i>attR</i>	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
LR Clonase™ II	LR-Reaktion <i>attL</i> x <i>attR</i> -> <i>attB</i> x <i>attP</i>	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)
TE Puffer	BP- und LR-Reaktion	Life Technologies GmbH Invitrogen (D)

2.1.15 Software

Software	Bezugsquelle
Adobe Reader X	Adobe Systems Software Ireland Ltd. (GB)
Optima Software, V2.20	BMG Labtech GmbH (D)
Microsoft Office 2010	Microsoft Deutschland GmbH (D)
Prism Graph Pad, V 5.0	GraphPad Software, Inc. (USA)
Reference Manager, V 11	Thomson Reuters Corporation (USA)
Sequence Navigator™	Applied Biosystems, Thermo Scientific Inc. (USA)
Zoner Draw, V 4	Zoner Inc. (USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Molekularbiologische Methoden

2.2.1.1 Anzucht von *E. coli*-Kulturen

Die Anzucht von *E. coli*-Kulturen erfolgte über Nacht bei 37°C in LB-Medium auf Agar-Platten bzw. in Falcon-Röhrchen oder Erlenmeyerkolben. Je nach Bedarf wurden zur Anzucht Antibiotika zugegeben.

2.2.1.2 Glycerin-Dauerkulturen für die langfristige Lagerung

Um *E. coli*-Kulturen längerfristig lagern zu können, wurden Glycerin-Stocks angelegt. Hierfür wurden von den gewünschten *E. coli*-Kulturen je 0,2 ml in 0,8 ml einer sterilen Lösung aus 50% Glycerol und 50% LB-Medium gegeben und anschließend bei -80°C eingefroren.

2.2.1.3 DNA-Transformation

DNA-Transformation bedeutet die Aufnahme freier DNA in Zellen. Für die Transformation wurden in der Regel chemisch kompetente *E. coli* DH5 α Zellen verwendet.

Zur Transformation wurden 50 μ l der auf Eis aufgetauten Zellen mit 2 μ l des gewünschten DNA-Plasmids versetzt. Dieser Ansatz wurde über 30 Minuten auf Eis inkubiert. Der auf diesen Kältestress folgende Hitzeschock bei 42°C über 90 Sekunden ermöglicht die DNA-Aufnahme in die chemisch kompetenten Zellen. Anschließend wurden die Zellen für 90 Sekunden wieder auf Eis gekühlt. In diesem Zeitraum verschließen sich die Poren der Zellmembran, es kann keine weitere DNA aufgenommen werden.

Zur Expression der Resistenzgene erfolgte nach Zugabe von 200 μ l LB-Medium eine 90-minütige Inkubation bei 37°C im Schüttelinkubator. Daran anschließend wurden 150 μ l des Transformationsansatzes zur Selektion der erfolgreich transformierten Zellen auf Ampicillin-haltigen Selektivagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nur diejenigen Zellen, die das Plasmid mit dem Ampicillin-Resistenzgen aufgenommen hatten, bringen Kulturen hervor.

Zur DNA-Transformation der Gateway[®]-Leervektoren wurden *One Shot ccdB Survival T1 Phage-Resistant* Zellen benutzt. Diese sind gegenüber dem toxischen Effekt (Hemmung der Bakteriengyrase) des ccdB-Gens resistent und deshalb besonders geeignet bei Vektoren, die dieses Gen enthalten, wie es bei den Gateway[®]-Vektoren der Fall ist. Die Transformation erfolgte analog zu der in *E. coli* DH5 α Zellen, mit dem Unterschied, dass der Hitzeschock bei 42°C nur über 30 Sekunden durchgeführt wird.

Nach Transformation wurden die Zellen auf ampicillin- und chloramphenicolhaltige Selektivagarplatten ausgestrichen.

2.2.1.4 Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen

2.2.1.4.1 Mini-Prep von Plasmid-DNA

Das Prinzip der Plasmidgewinnung besteht darin, ein Pellet aus rekombinanten Bakterien zu resuspendieren und im Anschluss zu lysieren. Die Isolierung von Plasmiden aus Bakterienkulturen wurde mit Hilfe des QIAGEN „QIAprepSpin Miniprep Kits“ nach Herstellerprotokoll durchgeführt. Durch Zugabe von speziellen, im Kit zur Verfügung gestellten Puffern kommt es zur Ausfällung von denaturierten Proteinen. Während Zellreste und denaturierte Proteine abzentrifugiert werden, bindet die DNA an eine mit einer positiv geladenen Silikat-Membran überzogenen Säule und kann so vom Überstand getrennt werden. Durch Zugabe von H₂O bidest. wird die DNA von der Säule gewaschen und kann in einem Reaktionsgefäß aufgefangen werden.

Durch Anwendung dieses Verfahrens können aus 5 ml Kulturen bis zu 20 µg DNA (Herstellerangabe) gewonnen werden.

2.2.1.4.2 Midi- und Maxi-Prep von Plasmid-DNA

Für größere Mengen an DNA wurde zur Plasmidisolation der Qiagen Midi- bzw. Maxi-Prep Kit verwendet.

Mit dem Midi-Prep System können aus 50 ml Bakterienkultur bis zu 250 µg Plasmid-DNA und mit dem Maxi-Prep System bis zu 1 mg Plasmid-DNA aus 250 ml Bakterienkultur gewonnen werden; zudem resultiert eine reinere DNA-Qualität. Die Verfahren wurden nach Herstellerprotokoll durchgeführt (Mengenangaben sind Herstellerangaben).

2.2.1.5 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Mit Hilfe des NanoDrop-Spektrophotometers kann die DNA-Konzentration in einem Probenvolumen von nur 1 µl bestimmt werden. Hierzu wurde die Extinktion der Probe bei 260 nm gegen einen Tropfen H₂O bidest (Leerwert) gemessen. Eine Extinktion von 1,0 entspricht hierbei einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml.

Um eventuelle Probenverunreinigungen durch Proteine festzustellen, wird auch die Extinktion bei 280 nm gemessen und der Quotient aus 260/280 gebildet. Der Quotient reiner DNA liegt bei 1,8; ist der Quotient kleiner als 1,8, liegt eine Verunreinigung vor.

2.2.1.6 Klonierung eines Vektors für die prokaroyte Expression der humanen Wildtyp-PAH und Varianten der PAH

2.2.1.6.1 Polymerase Kettenreaktion

Die Vervielfältigung der gewünschten Gene sowie die Klonierung der Restriktionsschnittstellen in die DNA-Fragmente erfolgten mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR). Als Vorlage wurde die entsprechende cDNA verwendet; die eingesetzten Primer sind unter Punkt 2.1.11 aufgelistet.

PCR-Ansatz	
DNA-Matrize	1 µl
Primer forward	1,5 µl
Primer reverse	1,5 µl
dNTPs	1 µl
<i>Pfu</i> -Polymerase	0,75 µl
<i>Pfu</i> -Puffer	5 µl
Aqua bidest	ad 20 µl

Im Mastercycler wurde mit folgendem Programm die Amplifikation durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Initiale Denaturierung	96°C	120 Sekunden	
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	30
Annealing	53°C	60 Sekunden	
Elongation	60°C	60 Sekunden	
Hold	4°C		

2.2.1.6.2 Site-Directed Mutagenesis

Ausgehend vom pENTRY-Vektor der Wildtyp-*PAH* wurden über die Methode der *Site-Directed Mutagenesis* (SDM) Punktmutationen in die cDNA der Wildtyp-*PAH* einbracht, um die gewünschten *PAH*-Varianten zu erhalten. Die SDM wurde von Dunja Reiß mit Hilfe des PCR-basierten QuikChange site-directed mutagenesis Kits von Stratagene durchgeführt; die Expressionsvektoren der varianten *PAH*-Varianten wurden mir von ihr zur Verfügung gestellt. Die SDM wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2.1.6.3 Vektor pMALc2E

Die cDNAs der humanen *PAH*, der murinen *PAH* und ihrer Varianten wurden im Anschluss an die SDM in den pMALc2E Expressionsvektor kloniert, der für ein N-terminales Maltose-bindendes Protein kodiert und eine Schnittstelle für das Enzym Enterokinase aufweist. Die in den Vektor klonierte cDNA der *PAH* wird als Fusionsprotein an das MBP gebunden exprimiert. Die Eigenschaft an Maltose zu binden, qualifiziert MBP als Trägerprotein zur Aufreinigung rekombinanter Fusionsproteine, denn erst dadurch wird die affinitätschromatographische Aufreinigung der Proteine ermöglicht. In einem späteren Schritt kann der MBP-Tag/Fusionspartner vom gewünschten Protein enzymatisch durch die Enterokinase abgespalten werden.

2.2.1.6.4 Vektor pMALc2X

Die cDNA der humanen *PAH* und ihrer Varianten wurde auch in den pMALc2X Expressionsvektor kloniert, der eine Schnittstelle für die Restriktionsprotease Faktor Xa aufweist. Wie pMALc2E kodiert auch dieser Vektor für einen N-terminalen MBP-Affinitätstag, der im exprimierten Fusionsprotein enzymatisch durch Faktor Xa abgespalten werden kann.

2.2.1.6.5 Gateway® Vektoren

Die oben beschriebene Klonierung von cDNAs in konventionelle pMALc2-Vektoren ist zeitaufwändig und häufig wenig effizient. Invitrogen hat eine neuartige Klonierungsmethode entwickelt, die auf dem Rekombinations-Prinzip des Lambda-Bakteriophagen beruht. Der λ -Phage ist ein Virus, der mit Hilfe bestimmter Enzyme seine DNA in das Genom eines Bakteriums integriert; dieser Vorgang stellt die Basis der Gateway®-Technologie dar.

Die Klonierung findet in zwei aufeinander folgenden Rekombinationsreaktionen statt, die als BP- und LR-Reaktionen (Gateway®-Nomenklatur) bezeichnet werden.

Im ersten Schritt werden innerhalb der lysogenen BP-Reaktion die „*Entry Clones*“ hergestellt, im zweiten Schritt erfolgt durch die lytische LR-Reaktion die Generierung von „*Expression Clones*“ (s.u.). Die DNA-Rekombination erfolgt innerhalb des Gateway®-Systems an spezifischen Verbindungsstellen, auch „*attachment (att)-sites*“ genannt. Das gewünschte Gen wird von *att*-sites flankiert und kann gegen – ebenfalls *att*-site-flankierte – Genfragmente im Zielvektor reversibel ausgetauscht werden.

Sofern nicht anders beschrieben, wurden für die Untersuchungen in dieser Doktorarbeit Plasmide verwendet, die über die Gateway®-Klonierungsmethode hergestellt wurden.

Generierung von *Entry Clones* über die BP-Reaktion

Zur Herstellung von *Entry clones* wird innerhalb der lysogenen BP-Reaktion das gewünschte Gen (z. B. ein PCR-Produkt oder ein linearisierter *Expression Clone*) in einen Donorvektor integriert. Im Fall der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich *att*-site-flankierte PCR-Produkte verwendet. Die Rekombination erfolgte an den spezifischen *att*-sites.

BP-Reaktion		
PCR-Produkt	50 ng	<i>attB</i> -flankiert
pDONR 221	150 ng	<i>attP</i> -flankiert
BP Clonase™ II	1 μ l	
TE-Puffer	ad 5 μ l	

Die Inkubation erfolgte in einem PCR-Cycler bei 25°C über 17 Stunden. Im Anschluss wurde die Reaktion durch Zugabe von 1 μ l Proteinase K bei 37°C über 10 Minuten beendet. Je 1 μ l des Reaktionsansatzes wurde für die Transformation von *E. coli* DH5 α ™ Zellen verwendet.

Mit Hilfe der *Entry Clones* kann in einem nächsten Schritt das gewünschte Gen mit geringem Aufwand in einen Expressionsvektor kloniert werden.

Generierung von *Expression Clones* über die LR-Reaktion

Expression Clones wurden durch eine im Rahmen der LR-Reaktion aus den unter 2.2.1.6.5.1 erstellten *Entry Clones* und DEST-Vektoren erstellt. Auch bei dieser Rekombinationsreaktion spielen die *att*-sites eine wichtige Rolle.

LR-Reaktion		
Entry Clone	50 – 150 ng	<i>attL</i> -flankiert
pDEST (pMALc2E/ pMALc2X)	150 ng	<i>attR</i> -flankiert
LR Clonase™ II	2 µl	
TE-Puffer	ad 8 µl	

Die Inkubation erfolgte bei 25°C über 1 bis 18 Stunden, wobei im Rahmen dieser Arbeit in der Regel über Nacht inkubiert wurde. Im Anschluss wurde die LR-Clonase durch 1 µl Proteinase K (37°C, 10 min) inaktiviert. Es folgte die Transformation von *E. coli* DH5α™ Zellen mit 1 µl des Reaktionsansatzes.

2.2.1.7 Restriktionsverdau mit Endonukleasen

Zur Kontrolle der richtigen Orientierung der cDNA innerhalb des Vektors erfolgte ein Restriktionsverdau durch Restriktionsendonukleasen.

Hierbei handelt es sich um Enzyme, die doppelsträngige DNA an spezifischen Erkennungssequenzen schneiden und somit zirkulär vorliegende DNA-Vektoren bzw. DNA-Plasmide linearisieren. Abhängig davon, an welcher Stelle der Vektor bzw. das Plasmid geschnitten werden soll, wird die jeweils spezifische Restriktionsendonuklease gewählt.

Einzelrestriktionsverdau	
DNA-Matritze	2,0 µl
Restriktionsendonuklease	0,3 µl
Puffer	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl
Doppelrestriktionsverdau	
DNA-Matritze	2,0 µl
Restriktionsendonuklease 1	0,3 µl
Restriktionsendonuklease 2	0,3 µl
Puffer	2,0 µl
Aqua bidest.	ad 10 µl

Die Restriktionsansätze wurden bei 37°C für 90 Minuten inkubiert.

Im Anschluss kann die Länge der entstandenen linearen DNA-Fragmente durch eine Agarose-Gelelektrophorese bestimmt werden. Durch Verwendung von einer oder zwei Restriktionsendonukleasen in verschiedenen Ansätzen entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge. So kann schnell und effizient eine Kontrolle der generierten Vektoren und Plasmide durchgeführt werden.

2.2.1.8 Agarose-Gelelektrophorese

Bei einer DNA-Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle in einem Agarosegel gemäß ihrer Größe aufgetrennt. Im Rahmen der Doktorarbeit wurde mit 0,9% Agarosegelen gearbeitet.

Zur Herstellung der Gele wurden 0,9 g LE-Agarose in 100 ml TBE-Puffer gegeben und für 2 Minuten gekocht. Nach Abkühlen auf etwa 60°C wurden 0,5 mg des Farbstoffs Ethidiumbromid zugesetzt. Die Aushärtung und Auspolymerisierung des Gels erfolgte in einer horizontalen Wanne und dauerte bei Raumtemperatur etwa 30 Minuten. Die Wanne zur Gelaushärtung wurde an einem Ende mit einem Kamm versehen, so dass Aussparungen im Gel entstehen, in die später die Proben pipettiert werden konnten.

Nach Aushärtung wurde das Gel in eine mit TBE-Puffer gefüllte Gelkammer gelegt. Von den zu untersuchenden DNA-Proben wurden je 10 µl mit jeweils 2 µl Ladepuffer (Gel Loading Solution) vermischt und in die Geltaschen aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden bei 100 V und etwa 100 mA für ca. 1 h im elektrischen Feld aufgetrennt. Ethidiumbromid interkaliert dabei in die DNA-Helix und fluoresziert bei Anregung durch UV-Licht, wodurch die DNA Fragmente visualisiert werden konnten. Ihre Länge ließ sich anhand eines Molekulargewichts-Standards abschätzen, der bei jeder Gelelektrophorese mitgeführt wird. Zur Dokumentation wurden die Agarosegele während der UV-Belichtung fotografiert.

2.2.1.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Um DNA-Fragmente nach einer Agarose-Gelelektrophorese weiter verwenden zu können, mussten diese aus dem Gel aufgereinigt werden. Hierfür wurde das QIAquick Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben verwendet. Bei dieser Methode werden die DNA-Fragmente zunächst aus dem Agarosegel gelöst, dann an eine Silikatmatrix auf einer Säule gebunden, mehrfach gewaschen und durch Zugabe von H₂O bidest. eluiert.

2.2.1.10 Sequenzierung der Plasmide nach Sanger

Um Fehler in der Basenabfolge der PAH auszuschließen, erfolgte die Sequenzierung des Plasmids mittels der Kettenabbruchmethode nach Sanger. Bei dieser Methode werden radioaktiv markierte Didesoxynukleotide (ddNTPs) zu einem DNA-Polymerisationsansatz gegeben. Bei diesen ddNTPs fehlt am 3'-C-Atom die Hydroxyl (OH⁻)-Gruppe, die für die Verknüpfung mit der Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids notwendig ist.

Bei Einbau eines solchen ddNTP anstelle eines Desoxyribonukleotides in den DNA-Strang kann keine weitere Elongation des Stranges erfolgen. Die Methode wird in vier verschiedenen Ansätzen durchgeführt, in denen jeweils ddNTPs eines bestimmten Nukleotid vorliegen – so kann im Anschluss an die DNA-Polymerisation eine Gelelektrophorese durchgeführt werden, in der die markierten Abbruchprodukte aus jedem Ansatz der Länge nach aufgetrennt werden. Über einen Vergleich der entwickelten Gele kann auf die Sequenz der DNA-Matrize geschlossen werden (Sanger *et al.* 1977).

Anstelle der radioaktiv markierten ddNTPs werden inzwischen Derivate des Fluoreszenzfarbstoffes Rhodamin aus dem BigDye®-System von Applied Biosystems verwendet, so dass die Methode im Unterschied zur Ursprünglichen in einem Ansatz durchgeführt werden kann.

Zur Probenvorbereitung wurde folgender Ansatz auf Eis pipettiert.

Material	Konzentration	Menge
DNA-Matrize	50 ng	1,0 – 2,0 µl
Primer (forward/ reverse)	10 pmol/µl	1,0 µl
BigDye®-Mix		2,0 µl
Aqua bidest		ad 5 µl

Im Mastercycler wurde mit folgendem Programm die Amplifikation durchgeführt.

Schritt	Temperatur	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung	96°C	15 Sekunden	30
Annealing	53°C	15 Sekunden	
Elongation	60°C	4 Minuten	
Hold	4°C		

Die weiteren Schritte der Sequenzierung wurden von der Firma Eurofins Medigenomix GmbH, Martinsried, durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mithilfe des Computerprogrammes Sequence Navigator™.

2.2.1.11 Proteinexpression aus pMALc2E/pMALc2X und pMALc2E/X DEST-Vektoren zur Durchführung eines Expressionstests

Die Kultur aus transformierten E.coli-Zellen wurde bei 37°C bis zu einem OD₆₀₀-Wert von 0,5 – 0,6 inkubiert. Dann erfolgte die Induktion der Proteinexpression durch Zugabe von 150 µl einer 0,1 molaren IPTG-Lösung. Dieser Ansatz wurde im Anschluss für weitere 20 - 24 Stunden bei 28°C (Gateway®-Klonierung) resp. 37°C (konventionelle Klonierung) inkubiert.

Ansatz	
Vorkultur	5 ml
LB-Medium	50 ml
Ampicillin	50 µl

Abschließend wurden jeweils 5 ml der Kultur in Falconröhrchen überführt, abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Die erhaltenen Bakterienpellets wurden entweder sofort weiter verarbeitet oder bis zum weiteren Gebrauch eingefroren.

2.2.1.12 Isolierung der Proteine aus *E.coli*-Zellen

Zur Isolierung der Proteine aus Bakterienkulturen wurden die nach der Proteinexpression erhaltenen Pellets in je 500 µl Lysepuffer auf Eis resuspendiert und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Für den Zellaufschluss wurde jede Probe dreimal je 15 Sekunden lang sonifiziert und währenddessen auf Eis, das zur weiteren Absenkung der Temperatur mit Ethanol versetzt war, gekühlt.

Einstellungen (Proteinexpression)	
Zeit	15 Sekunden
Amplitude	10 %
Puls	0,8 Sekunden
Pause	0,2 Sekunden

Im Anschluss wurden die sonifizierten Lösungen über 15 Minuten bei 14 000 Umdrehungen/Minute bei 4°C abzentrifugiert, um lösliche von unlöslichen Zellbestandteilen zu trennen. Die Proteine befanden sich im Überstand.

2.2.1.13 Proteinexpression und -isolierung zur Proteinaufreinigung

Um größere Mengen an Proteinen zu erhalten, wurde eine Hauptkultur hergestellt.

Ansatz	
Vorkultur	20 ml
LB-Medium	1000 ml
Ampicillin	1 ml

Die Proteinexpression wurde wie unter 2.2.1.11 beschrieben durchgeführt. Um ein gutes Wachstum der Bakterienkultur zu gewährleisten, wurde das LB-Medium mit 10 ml Glukose versetzt. Um die aus den Hauptkulturen resultierenden Pellets zu sonifizieren, wurden diese

zunächst in 20 ml HEPES-NaCl-Puffer gelöst. Zur Sonifizierung wurden folgende Einstellungen gewählt.

Einstellungen	
Zeit	45 Sekunden
Amplitude	10 %
Puls	0,8 Sekunden
Pause	0,2 Sekunden

Für den Zellaufschluss wurde jede Probe in fünf Zyklen sonifiziert und in den Pausen in einem Eis-Ethanolgemisch gekühlt.

2.2.1.14 Aufreinigung der rekombinanten MBP-PAH Fusionsproteine durch Affinitäts- und Größenausschlusschromatographie

Um aus dem unter 2.2.1.12 gewonnen Rohextrakt das gewünschte PAH-Fusionsprotein zu isolieren, erfolgte zunächst die affinitätschromatographische Proteinaufreinigung. Diese wurde bei 4°C an der ÄKTExpress mit einer MBPTrap-Amyloseharzsäule durchgeführt. Mit dieser Amyloseharzsäule wird die hohe Bindungsaffinität des MBP an Amylose ausgenutzt: Das MBP-PAH Fusionsprotein bindet an die Amylose, während andere, überschüssige Zelllysatzbestandteile von der Säule gewaschen werden. Die Elution des Fusionsproteins erfolgt durch einen maltosehaltigen Säulenpuffer.

In einem zweiten Schritt werden die gewonnenen Fusionsproteine durch Größenausschlusschromatographie an der HiLoad 16/60 Superdex 200 Säule der Größe nach aufgetrennt. Diese Säule besteht aus einer porösen Matrix aus quervernetzter Agarose. Während kleinere Proteine in die Poren diffundieren können, durchlaufen größere Moleküle nur die Zwischenräume der Poren, haben demnach eine kürzere Wegstrecke zurückzulegen und werden schneller von der Säule eluiert als kleinere Moleküle. In Bezug auf die PAH wurden somit zunächst hochmolekulare Aggregate eluiert, gefolgt von MBP-PAH-Tetrameren (380 kDa), MBP-PAH-Dimeren (190 kDa) und MBP-PAH-Monomeren (95 kDa). Die Fraktionen der Tetramere wurden gesammelt und aufkonzentriert. Abschließend erfolgte die photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration. Die Reinheit der Proteine wurde durch eine abschließende SDS-Gelelektrophorese kontrolliert.

Die beschriebene Aufreinigung der Enzyme wurde von Frau Dunja Reiß übernommen. Die Enzyme wurden mir freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

2.2.1.15 Bestimmung der Proteinkonzentration

2.2.1.15.1 Photometrische Bestimmung bei A_{280}

Die Absorption der Seitenketten aromatischer Aminosäuren bei einer Wellenlänge von 280 nm kann zur einfachen Bestimmung der Proteinkonzentration genutzt werden.

Hierzu wurde die Proteinlösung mit HEPES-Puffer verdünnt (i.d.R. 1:50 bzw. 1:100). Mindestens drei der verdünnten Lösungen wurden im Photometer mit Licht einer Wellenlänge von 280 nm angeregt und die Absorption bestimmt. Als Referenzwert diente HEPES-Puffer. Um die Konzentration zu berechnen, wurde der Mittelwert der gemessenen Absorptionen gemäß dem Lambert-Beerschen Gesetz durch den Absorptionskoeffizienten (ϵ_{280} (1 mg/ml) = 1,63 beim Fusionsprotein und 1,0 bei der geschnittenen PAH) dividiert und mit dem Verdünnungsfaktor multipliziert.

2.2.1.15.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Der Bradfordtest dient der photometrischen Bestimmung der Proteinkonzentration mit Hilfe des Triphenylmethanfarbstoffs Coomassie-Brilliant-Blau, der an basische Seitenketten von Proteinen binden kann. In seiner ungebundenen (roten) Form liegt sein Absorptionsmaximum bei 470 nm. Bindet er jedoch an Proteine, kommt es zur Komplexbildung, die mit einer Blaufärbung und Verschiebung des Absorptionsmaximums auf 595 nm einhergeht. Um eine möglichst genaue Konzentration des Proteins zu erhalten, wurden unterschiedliche Proteinverdünnungen hergestellt und mit dem Coomassie-Farbstoff versetzt. In der Regel wurden Proben verwendet, in denen die Proteine in Konzentrationen von 1:20, 1:10, 1:5 oder unverdünnt vorlagen. Im FluoStarOPTIMA wurde die Proteinkonzentration gegen eine Standardproteinreihe spektrophotometrisch bestimmt. Als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin (BSA) verwendet.

2.2.2 Fluoreszenzspektrophotometrische Messungen

Die Fluoreszenzmessungen wurden an einem CaryEclipse Fluoreszenz-Spektrophotometer durchgeführt. Jeweils vier Küvetten konnten gleichzeitig in einem temperaturkontrollierten Peltier multicell holder (Varian) analysiert werden.

Alle Experimente wurden, soweit nicht anders angegeben, mindestens als Triplikat durchgeführt. Alle Ergebnisse sind als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben.

2.2.2.1 Differential Scanning Fluorimetry

Mit der Methode der *differential scanning fluorimetry* (DSF) kann die thermische Denaturierung der PAH-Proteine analysiert werden. Um die Denaturierung über einen festgelegten Zeitpunkt zu beobachten wurde der Farbstoff 8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure (ANS) eingesetzt. Dieser fluoresziert, sobald er an hydrophobe Seitenketten eines Proteins bindet. Diese hydrophoben Seitenketten befinden sich im nativen Zustand vorwiegend im Inneren eines Proteins; daher ist die durch gebundenen Farbstoff hervorgerufene Fluoreszenzintensität zunächst gering. Wird das Protein nun erhitzt, beginnt es, sich zu entfalten. Während der Entfaltung gelangen die hydrophoben Seitenketten zunehmend an die Oberfläche des Proteins, und ANS kann vermehrt daran binden. Dadurch steigt das

Fluoreszenzsignal. So kann über die Zunahme der Fluoreszenzintensität die Denaturierung des jeweiligen Proteins beobachtet werden.

Die zu messenden Probenlösungen enthielten 6 μM PAH Protein in 20 mM Na-HEPES, 200 mM NaCl, 10 μM DTT und 10 μM Fe-Ammoniumsulfat sowie 1 mM ANS bei einem Probenendvolumen von 120 μl . BH_4 , BH_2 und Sepiapterin wurden in finalen Konzentrationen von 43 μM , 75 μM und 200 μM eingesetzt. 6-MPH₄ wurde aufgrund einer niedrigeren Bindungsaffinität (Martinez *et al.* 1995) in höheren finalen Konzentrationen von 200 μM , 500 μM und 1000 μM zugegeben. Der Nullabgleich erfolgte vor jeder Messung mit Puffer (Na-HEPES, DTT, Fe-Ammoniumsulfat in den oben genannten Konzentrationen). Die Lösungen wurden vor Beginn der Messungen für zwei Minuten bei 25°C equilibriert.

Die Analyse der thermisch induzierten Proteinentfaltung mittels ANS-Fluoreszenz erfolgte nach Zugabe von BH_4 , BH_2 und 6-MPH₄ bei einer Emissionswellenlänge von 500 nm (Exzitationswellenlänge 395 nm, 5,0/10,0 nm Schlitzweite (Matulis *et al.* 2005; Hawe *et al.* 2008; Pey *et al.* 2008a)), während die Messungen nach Zugabe von Sepiapterin aufgrund der Eigenfluoreszenz von Sepiapterin bei einer Emissionswellenlänge von 480 nm und sonst gleichen Einstellungen durchgeführt wurden. Die Proteinentfaltung wurde im Temperaturbereich zwischen 25 und 60°C und einer Scan-Rate von 1,2°C pro Minute analysiert.

Sofern nicht anders beschrieben, waren alle verwendeten Proteine mit Faktor Xa geschnitten und stammten aus unterschiedlichen Proteinaufreinigungen.

2.2.2.2 Kinetische Analyse der Denaturierung

Die Untersuchung der zeitabhängigen Denaturierung erfolgte analog zu ANS-DSF bei einer Emissionswellenlänge von 500 nm bzw. 480 nm, einer Exzitationswellenlänge von 395 nm und Schlitzweite von 5,0/10,0 nm. Die Entfaltung wurde bei fest eingestellten Temperaturen von 41,5°C, 43°C, 44,5°C, 46°C und 47°C für den PAH-Wildtyp und die Variante R68S, sowie 38°C, 40°C, 42°C, 44°C und 46°C für die Varianten R261Q und Y417H der PAH durchgeführt. Die Messdauer variierte protein- und temperaturabhängig zwischen 35 und 100 Minuten. Die Zusammensetzung der untersuchten Proben erfolgte wie unter 2.2.2.1 beschrieben.

2.2.2.3 Trübungsmessung

Durch Trübungsmessungen kann eine temperaturabhängige Aggregation der Proteine und die damit einhergehende Bildung von löslichen Aggregaten beobachtet werden. Proteinaggregation entsteht dann, wenn hydrophobe Bereiche entfalteter Proteine miteinander in Wechselwirkung treten. Durch die entstehenden Proteinaggregate wird einfallendes Licht im rechten Winkel gestreut und kann gemessen werden. Deshalb wird diese Form der Untersuchung der Proteindenaturierung auch als „Right Angle Light

Scattering“ bezeichnet. Als Exzitationswellenlänge wurden 330 nm verwendet, das gestreute Licht wurde bei einer Wellenlänge von 335 nm gemessen.

2.2.2.4 Statistische Auswertung

Zur statistischen Auswertung wurde das Programm Prism 5.0 verwendet. Alle hier beschriebenen Gleichungen können in diesem Programm berechnet werden.

2.2.2.4.1 Auswertung der thermischen Proteindenaturierung

Die *Fraction unfolded* (χ_U) der um die Eigenfluoreszenz des Puffers korrigierten Fluoreszenzspektren wurde durch folgende Gleichung berechnet (Pey *et al.* 2008b).

$$\chi_U = [F - (F_N + m_N \times T)] / [(F_U + m_U \times T) - (F_N + m_N \times T)].$$

Hierbei entspricht F der experimentell bestimmten Fluoreszenzintensität, T der Temperatur in °C, F_N und F_U sind die Fluoreszenzintensitäten des nativen und des entfalteten Zustands. Die Neigung der linearen Temperaturabhängigkeit wird über m_N und m_U eingebracht. Die *Fraction unfolded* (χ_U) wurde aus drei voneinander unabhängigen Experimenten berechnet.

Um die temperaturabhängige Entfaltung der PAH nach Zugabe unterschiedlicher Konzentrationen des Kofaktors BH₄ vergleichen zu können, wurden mit Hilfe der Boltzmann-Sigmoidalgleichung die Temperaturübergänge (T_m -Wert) berechnet. Der T_m -Wert beschreibt den Wendepunkt, bei dem die Hälfte des Proteins bereits entfaltet vorliegt.

2.2.2.4.2 Auswertung der kinetischen Proteindenaturierung

Zur Auswertung der zeitabhängigen Denaturierung wurden die Daten von jeweils drei voneinander unabhängigen Messungen analysiert und in die *one-phase-association* Gleichung eingesetzt, mit der sich eine einphasige, exponentielle Abhängigkeit beschreiben lässt.

$$Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - \exp(-k \cdot x))$$

Y_0 entspricht hierbei dem Y-Wert zum Zeitpunkt Null ($x = 0$), k entspricht der Konstante, die dem Kehrwert der x-Achse entspricht, in diesem Fall also reziproke Minuten. Das Plateau ist erreicht, wenn sich der Y-Wert nicht mehr verändert.

Mit Hilfe der Konstante K lässt sich über die Arrheniusgleichung die Aktivierungsenergie des Enzyms berechnen.

$$\ln(k) = - (E_a/R) \cdot 1/T + \ln(A)$$

E_a ist dabei die Aktivierungsenergie, R entspricht der universellen Gaskonstante (8,314 J mol⁻¹·K⁻¹), T der Temperatur in Kelvin, k der oben berechneten Geschwindigkeitskonstante und A dem präexponentiellen Faktor (Arrheniusfaktor). Die Steigung m entspricht dabei dem

Ausdruck $-(E_a/R)$. Somit kann die Aktivierungsenergie aus der Geradensteigung m berechnet werden.

$$E_A = - m \times R.$$

2.2.2.4.3 Auswertung der *Right Angle Light Scattering* Messungen

Aus den gewonnenen Daten wurden mit Hilfe der Boltzman-Sigmoidalgleichung in Prism die Temperaturübergangspunkte (T_m) berechnet. Die Steigung der Geraden, die die Aggregation beschreibt, wurde über eine Exponentialgleichung erster Ordnung berechnet.

3. Ergebnisse

Ziel der Arbeit war die Untersuchung des Einflusses des natürlichen Kofaktors BH_4 auf die thermische und kinetische Proteindenaturierung sowie auf die Proteinaggregation des PAH-Wildtyp-Proteins und varianter Proteine. Zum besseren Verständnis der Struktur-Wirkungs-Beziehung von BH_4 sollte die vergleichende Charakterisierung des Effekts von BH_4 und seinen Derivaten BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ auf den PAH-Wildtyp und seine Varianten R68S, R261Q und Y417H erfolgen.

Um diese Ziele zu erreichen, mussten zunächst einige in der Arbeitsgruppe bereits etablierte Methoden wie die temperatur- und zeitabhängige Denaturierung der PAH sowie die Methode des *right angle light scattering* auf die neuen Fragestellungen angepasst werden.

Die für diese Doktorarbeit erforderlichen Etablierungsexperimente werden in Kapitel 3.1 beschrieben; in den darauf folgenden Kapiteln schließen die daraus resultierenden Ergebnisse an.

3.1 Etablierung spektrophotometrischer Methoden und Auswahl der Kofaktoren

3.1.1 Abhängigkeit der Übergangstemperatur des murinen PAH Wildtyps von der Geschwindigkeit der Erwärmung während der thermischen Denaturierung

Zur Analyse der Entfaltung der PAH-Proteine wurde der Farbstoff 8-Anilino-1-naphthalensulfonsäure eingesetzt. Dieser Farbstoff emittiert ein Fluoreszenzsignal, sobald er an hydrophobe Seitenketten eines Proteins bindet, nicht aber, wenn er gelöst in Puffer vorliegt. Um den Mechanismus der thermischen Denaturierung zu analysieren, wurde die Zunahme des ANS-Fluoreszenzsignals in einem definierten Temperaturintervall gemessen. Die Erwärmung der Probe in Grad Celsius pro Minute wurde dabei über die Scan-Rate, also die Dauer der schrittweisen Erhöhung der Temperatur, geregelt. Je geringer die eingestellte Scan-Rate, desto weniger wird die Probe in einer Minute erhitzt und desto länger dauert die Untersuchung mit einem festgesetzten Endpunkt.

Um herauszufinden, ob die Scan-Rate einen Einfluss auf die Messergebnisse hat, wurde die Abhängigkeit der Übergangstemperatur von der Scan-Rate untersucht. Für diese Messungen wurde die bisher in der Arbeitsgruppe verwendete Scan-Rate von $1,2^\circ\text{C}/\text{min}$ als Ausgangswert verwendet; ihr gegenübergestellt wurden Scan-Raten von $0,2^\circ\text{C}/\text{min}$ und $0,7^\circ\text{C}/\text{min}$, sowie $2,0^\circ\text{C}/\text{min}$, bei der der festgesetzte Endpunkt schneller erreicht wird. Abbildung 3 zeigt den Übergang des murinen PAH-Wildtyps vom nativen in den denaturierten Zustand in Abhängigkeit von der Temperatur. Die Messung wurde bei einer

Temperatur von 25°C begonnen und nach Erreichen der maximalen Fluoreszenzintensität beendet.

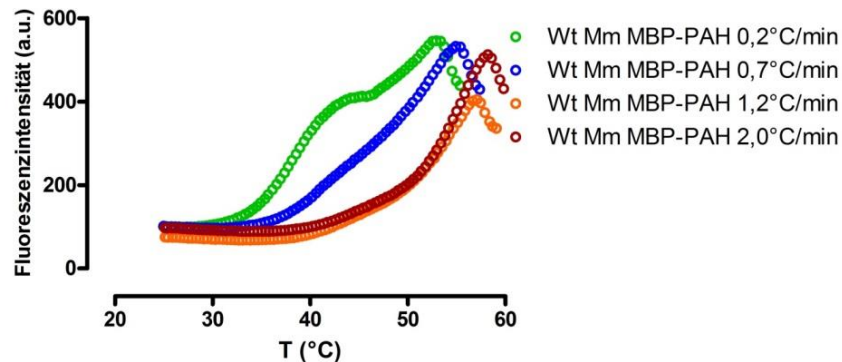


Abbildung 3: Temperaturabhängige Entfaltung des murinen PAH-Wildtyp Proteins bei unterschiedlichen Scan-Raten.

Mit zunehmender Temperatur steigt die Fluoreszenzintensität an, das heißt, dass zunächst frei vorliegendes ANS an hydrophobe Seitenketten des Proteins bindet und daraufhin eine stärkere Fluoreszenz detektierbar ist. Ab einer gewissen Temperatur erreicht die Fluoreszenzintensität ein Maximum: das Protein liegt in gänzlich entfaltetem Zustand vor, es werden keine weiteren ANS-Bindungsstellen frei. Bei einer weiteren Temperaturerhöhung wird die Stärke des Fluoreszenzsignals geringer, ANS kann entweder nicht mehr gebunden werden oder das Signal wird durch Störfaktoren im untersuchten Material nicht mehr detektiert. Dies spricht für eine zunehmende Aggregation der Proteine bei hohen Temperaturen.

Während der Entfaltung weist die Wildtypform der murinen PAH vor und nach Zugabe des Kofaktors BH_4 zwei Temperaturübergänge ($T_{m1/2}$ und $T_{m2/3}$; Tabelle 2) auf. Dieses Entfaltungsmuster wurde bereits früher beschrieben und bildet die Grundlage für das Modell der dreiphasigen Entfaltung der murinen sowie humanen PAH (Thorolfsson *et al.* 2002). Der erste Temperaturübergang ($T_{m1/2}$) entspricht der Entfaltung der vier N-terminalen regulatorischen Enzymdomänen. Der zweite Temperaturübergang ($T_{m2/3}$) zeigt die Entfaltung der katalytischen Domänen. Das im Anschluss erreichte Fluoreszenzmaximum repräsentiert den Zustand der irreversiblen Proteindenaturierung (Thorolfsson *et al.* 2002; Gersting *et al.* 2008).

Bei Vergleich der Denaturierungskurven fällt eine deutliche Rechtsverschiebung, also eine Entfaltung bei höheren Temperaturen, bei erhöhten Scan-Raten auf. Zur genauen Analyse erfolgte ein Vergleich der $T_{m1/2}$ und $T_{m2/3}$ -Werte.

Wt Mm PAH	0,2°C/min	0,7°C/min	1,2°C/min	2,0°C/min
$T_{m1/2}$ in °C	38,29	41,72	47,90	47,76
$T_{m2/3}$ in °C	51,24	52,37	54,38	55,14

Tabelle 2: Vergleich der T_m -Werte nach Proteindenaturierung mit unterschiedlichen Scan-Raten.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Scan-Rate einen deutlichen Einfluss auf die Denaturierung der PAH-Proteine hat. Je mehr Zeit jedem Temperaturschritt gegeben wird, also je weniger Erwärmung in °C pro Minute, desto früher entfalten die Domänen der PAH und desto niedriger ist die Temperatur, bei der eine vollständige Denaturierung des Proteins erreicht wird. Daher ist es notwendig, dass für alle vergleichenden Untersuchungen auch die gleiche Scan-Rate verwendet wird. Mit steigenden Scan-Raten fallen die Unterschiede in den T_m -Werten geringer aus, es scheint zu einer Stabilisierung der Entfaltungsgeschwindigkeit bei höheren Scan-Raten zu kommen. Bei geringeren Scan-Raten besteht allerdings der Vorteil, dass aufgrund der langsameren Erhitzung mehr Datenpunkte zur Analyse vorliegen und die Entfaltung dadurch detaillierter abgebildet wird. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurde deshalb für alle weiteren Untersuchungen die Scan-Rate von 1,2°C/min gewählt. Die resultierenden Übergangstemperaturen stimmen darüber hinaus gut mit den bereits bekannten Werten aus der Literatur überein.

3.1.2 Auswahl eines geeigneten PAH-Konstrukts für DSF-Messungen

Zur Expression der PAH kann auf unterschiedliche Expressionsvektoren zurückgegriffen werden. Nachdem sich die Klonierung der Expressionsplasmide über das Gateway® Cloning System der Firma Life Technologies GmbH, Invitrogen, durch einige Vorteile gegenüber der in unserer Arbeitsgruppe bereits etablierten konventionellen Klonierungsmethode auszeichnet, wurden Untersuchungen bezüglich der Vergleichbarkeit der aus pMALc2X DEST (Gateway Klonierung) und pMALc2X (konventionelle Klonierung) exprimierten Proteine durchgeführt. Beide Proteine enthalten zwischen Affinitätstag und PAH eine Schnittstelle für Faktor Xa. Für die in Abbildung 5 dargestellten DSF-Messungen wurden die von ihrem Fusionspartner abgetrennten PAH-Proteine verwendet.

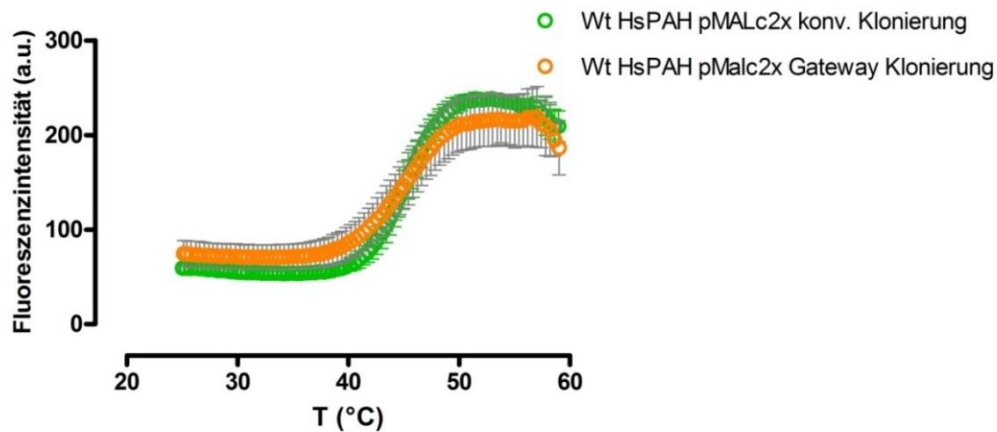


Abbildung 4: Vergleich der temperaturabhängigen Denaturierung zweier humaner PAH-Wildtyp Proteine, die über unterschiedliche Klonierungssysteme hergestellt und aufgereinigt wurden. Das in grün abgebildete PAH-Wildtyp-Protein resultiert aus konventioneller Klonierung, das in orange abgebildete PAH-Wildtyp-Protein aus dem Gateway-Klonierungssystem.

Der Vergleich der T_m -Werte der über verschiedene Klonierungssysteme hergestellten und aufgereinigten PAH-Proteine zeigt keinen signifikanten Unterschied. Daher wurde bei allen weiteren DSF-Untersuchungen von humaner PAH das durch Anwendung der Gateway-Technologie hergestellte Plasmid zur Expression der PAH verwendet.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)
Wt PAH pMALc2X Gateway®-Klonierung	45,22	-	50,40	-
Wt PAH pMALc2E konventionelle Klonierung	45,25	0,03	51,18	0,78

Tabelle 3: Vergleich der T_m -Werte der aus unterschiedlichen Klonierungssystemen aufgereinigten PAH-Wildtyp-Proteine.

Das PAH-Protein kann sowohl basierend auf dem Vektor pMALc2E als auch auf dem Vektor pMALc2X exprimiert werden. Je nach Vektor liegt dann zwischen dem Affinitäts-tag MBP und der PAH entweder eine Schnittstelle für die Restriktionsprotease Enterokinase (pMALc2E) oder für Faktor Xa (pMALc2X) vor - unabhängig davon, ob das Plasmid konventionell oder durch Verwendung der Gateway-Technologie kloniert wurde.

Im Gegensatz zur Enterokinase, die ausschließlich an der für sie vorgesehenen Schnittstelle schneidet, existiert bei Faktor Xa eine weitere Schnittstelle innerhalb der PAH. Diese zweite Schnittstelle befindet sich zwischen Arginin 13 und Lysin 14 der humanen PAH-Sequenz, so dass bei Inkubation mit Faktor Xa die 13 N-terminalen Aminosäuren des PAH-Proteins abgespalten werden. Aus Kostengründen wäre die Verwendung des mit Faktor Xa geschnittenen Proteins vorzuziehen. Um herauszufinden, ob sich der Verlust der 13 N-

terminalen Aminosäuren auf die Stabilität der PAH auswirkt, wurden die mit den beiden verschiedenen Proteasen inkubierten Proteine miteinander verglichen.

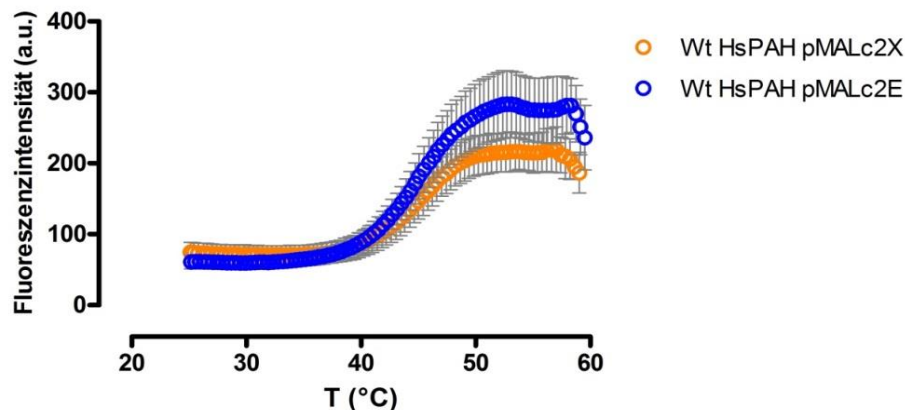


Abbildung 5: Vergleich der temperaturabhängigen Denaturierung zweier humaner PAH-Wildtyp Proteine, beide aus Gateway-Vektoren aufgereinigt. Der in orange abgebildete PAH-Wildtyp wurde aus dem Vektor pMALc2X DEST exprimiert und aufgereinigt, das MBP-Tag wurde mittels Faktor Xa von der PAH abgespalten. Das in blau dargestellte PAH-Wildtyp-Protein wurde aus dem Vektor pMALc2E DEST exprimiert, aufgereinigt und im Anschluss mit Hilfe des Enzyms Enterokinase vom MBP-Tag getrennt.

Für diese Untersuchungen wurde humanes Wildtyp-PAH Protein verwendet, dessen cDNA unter Verwendung der Gateway®-Technologie in die entsprechenden Vektoren kloniert worden war.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)
Wt PAH pMALc2X	45,25	-	51,18	-
Wt PAH pMALc2E	44,89	-0,36	51,63	0,45

Tabelle 4: Vergleich der T_m -Werte der mit Faktor Xa bzw. Enterokinase geschnittenen PAH-Wildtyp Proteine.

Der Vergleich der T_m -Werte der unterschiedlich geschnittenen PAH-Proteine zeigt keinen signifikanten Unterschied. Daher können für die DSF-Messungen PAH-Proteine verwendet werden, deren Maltose bindendes Protein nach der Aufreinigung mittels Faktor Xa abgetrennt wurde und deren N-Terminus dadurch ggf. um 13 Aminosäuren verkürzt ist.

Alle Messungen der DSF-Untersuchungen wurden in drei voneinander unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Proteine wurden aus Gateway®-Plasmiden exprimiert, aufgereinigt und mit Faktor Xa geschnitten.

3.1.3 Etablierung des Assays zur kinetischen Proteindenaturierung

Bei Messung der zeitabhängigen Denaturierung wird ein Protein bei einer voreingestellten Temperatur über ein bestimmtes Zeitintervall denaturiert und die sich verändernde Fluoreszenzintensität gemessen. Im Unterschied zur thermischen Denaturierung erfolgt also

kein gradueller Temperaturanstieg mit einer definierten Scan-Rate. Das Fluoreszenzsignal wird, wie bei der thermischen durch die an hydrophobe Seitenketten gebundenen ANS-Moleküle hervorgerufen.

Die Auswahl der Temperaturen, bei denen die kinetischen Analysen durchgeführt wurden, erfolgte basierend auf den temperaturabhängigen Entfaltungskurven. Für den Wildtyp sowie für die Variante R68S wurden daraufhin fünf Temperaturstufen zwischen 41,5°C und 47,5°C für die Durchführung der kinetischen Denaturierung gewählt. Bei den Varianten R261Q und Y417H beginnt die Denaturierung schon bei deutlich geringeren Temperaturen. Deshalb wurden für diese Varianten fünf Temperaturstufen zwischen 38,0°C und 46,0°C zur weiteren Charakterisierung festgelegt.

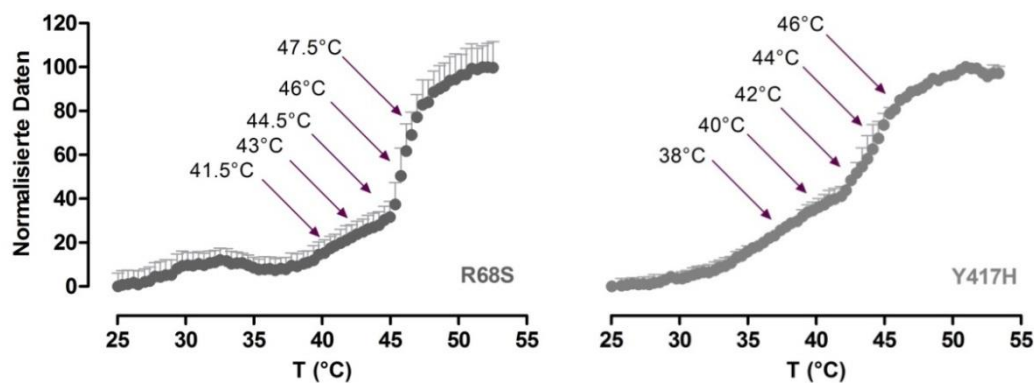


Abbildung 6: Auswahl der Temperaturen für die kinetische Proteindenaturierung am Beispiel der PAH-Varianten R68S und Y417H.

3.1.4 Messung der Proteinaggregation

Über eine Trübungsmessung lässt sich die Aggregation von Proteinen in einer Lösung über die Zeit beobachten. Diese Methode des *right angle light scattering*, also die Detektion von Lichtstreuung im rechten Winkel zur Strahlungsquelle, hatten unter anderem auch Kleppe et al. bei ihrer Untersuchung der durch Harnstoff induzierten Proteinentfaltung verwendet (Kleppe & Haavik 2004). In diesen Untersuchungen war als Emissionswellenlänge 300 nm verwendet worden (Exzitation 295 nm). Da es bei dieser Wellenlänge zu einer ausgeprägten Fluoreszenzlöschung durch BH₄ kommt, wurde für die Messungen im Rahmen der Doktorarbeit die Emissionswellenlänge von 335 nm (Exzitation 330 nm) verwendet.

3.1.5 Auswahl der zu untersuchenden PAH-Varianten

Die Wahrscheinlichkeit einer BH₄-Responsivität nimmt mit Zunahme des Schweregrades der PKU ab. So liegt die Häufigkeit eines BH₄-responsiven Phänotyps bei den Patienten mit klassischer PKU bei lediglich 10% und steigt bei Patienten mit milder PKU auf über 80% an

(Muntau *et al.* 2002; Fiege & Blau 2007; Camp *et al.* 2014). Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden demnach drei PAH-Varianten des PAH-Proteins gewählt, die bei Patienten aufgrund ihrer hohen Restaktivität (Staudigl *et al.* 2011) eine milde HPA zeigen. Die gewählten Varianten werden durch Mutationen verursacht, die in den drei verschiedenen Domänen der PAH liegen. Sie sind als BH₄-sensitive Varianten bekannt, zeigen aber ein unterschiedliches Ansprechen auf eine Therapie mit dem Kofaktor (Erlandsen *et al.* 2004; Staudigl *et al.* 2011; Leuders *et al.* 2014).

Die Mutation R68S führt in der regulatorischen Domäne der PAH zu einem Austausch der Aminosäure Arginin durch Serin an Position 68. Die Mutation R261Q liegt in der katalytischen Domäne der PAH, hier wurde Arginin an Position 261 durch Glutamin ersetzt. Diese Mutation führt zu einem Phänotyp am Übergang von der milden zur klassischen PKU. Bei der dritten untersuchten Variante Y417H kommt es zu einem Austausch der Aminosäure Tyrosin durch Histidin an Position 417 in der Oligomerisierungsdomäne (Erlandsen *et al.* 2004).

3.1.6 Auswahl der Kofaktoren

Sapropterindihydrochlorid (Kuvan[®]), die synthetische Form von BH₄ als natürlicher Kofaktor der PAH, wird bereits erfolgreich in der Therapie der PKU eingesetzt, es wirkt jedoch nicht bei allen Formen der Erkrankung.

Um den Wirkmechanismus von BH₄ besser zu verstehen, bzw. um herauszufinden, welcher strukturelle Anteil des BH₄-Moleküls für die Wirkung auf die PAH verantwortlich ist, wurde in dieser Arbeit sein Effekt mit dem seines oxidierten Analogons BH₂ und seiner Vorstufe Sepiapterin (SP) sowie des synthetischen Kofaktoranalogs 6-MPH₄ verglichen.

Um diesen Vergleich anstellen zu können, wurden zunächst die Strukturformeln der verschiedenen Kofaktoren auf Ähnlichkeiten und Unterschiede hin analysiert. Hauptaugenmerk lag dabei auf den Unterschieden im Ringsystem bzw. der Dihydroxypropylseitenkette.

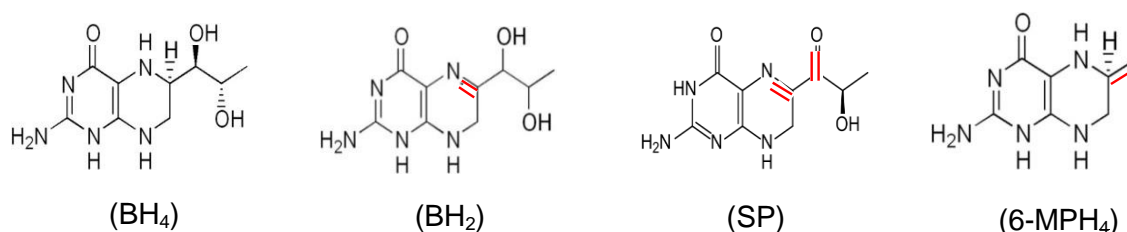


Abbildung 7: Strukturformeln des Kofaktors BH₄ und seiner Derivate BH₂, Sepiapterin (SP) und 6-MPH₄. Rot markiert sind die strukturelle Unterschiede im Vergleich zu BH₄.

Der Kofaktor BH₄ wird während des durch die PAH katalysierten Abbaus von Phenylalanin zu Tyrosin zu BH₂ oxidiert. BH₂ weist somit im Vergleich zu BH₄ ein oxidiertes Ringsystem

auf, während die Seitenkette mit der von BH_4 identisch ist. Auch Sepiapterin verfügt wie BH_2 über ein höher oxidiertes Ringsystem. Es unterscheidet sich von BH_2 durch eine höher oxidierte Seitenkette in der die Hydroxylgruppe (OH) durch eine Carbonylgruppe ($\text{C}=\text{O}$) ersetzt ist. Das Pteringrundgerüst von 6-MPH₄ ist mit dem von BH_4 identisch, allerdings ist in 6-MPH₄ die Dihydroxypropylseitenkette durch eine kurze Methylgruppe (CH_3) ersetzt.

3.1.7 Auswahl der Kofaktor-Konzentrationen

Bei den im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Messungen der thermischen und kinetischen Denaturierung wurde der Effekt unterschiedlicher Konzentrationen des Kofaktors BH_4 und seiner Derivate untersucht, um zu analysieren, wie sich unterschiedliche Kofaktorkonzentrationen auf die Stabilität des Enzyms auswirken.

Der Kofaktor BH_4 wurde in allen Assays in den finalen Konzentrationen von 43 μM , 75 μM und 200 μM eingesetzt. Die Konzentration von 43 μM wurde gewählt, nachdem bei *in vitro*-Untersuchungen an PAH-Wildtyp-Mäusen 30 Minuten nach Gabe von 10 mg/kg Körpergewicht Tetrahydrobiopterin – es handelt sich hier um die übliche Initialdosis bei der Behandlung von Patienten – eine BH_4 -Spitzenkonzentration von durchschnittlich 43 μM BH_4 in Leberzellen gemessen wurde (Gersting *et al.* 2010a). Um zu untersuchen, ob höhere Dosen eine andere Wirkung erzielen, wurde zusätzlich mit BH_4 -Konzentrationen von 75 μM sowie 200 μM gearbeitet. Diese Konzentrationen wurden in Studien anderer Arbeitsgruppen als Standardkonzentrationen für die Durchführung von PAH-Aktivitätsmessungen (Martinez *et al.* 1995) sowie PAH-Inhibierungsuntersuchungen (Solstad *et al.* 2003) verwendet. Die in den Assays eingesetzten finalen Konzentrationen der BH_4 -Derivate BH_2 und Sepiapterin entsprachen den für BH_4 definierten Konzentrationen. Das synthetische Kofaktoranalogue 6-MPH₄ hat einen deutlich höheren K_m -Wert als BH_4 (Martinez *et al.* 1995), sodass bei Verwendung der gleichen Konzentrationen keine vergleichbare Substratsättigung vorliegen würde. Deshalb wurden für diese Untersuchungen 6-MPH₄-Konzentrationen von 200 μM , 500 μM und 1000 μM gewählt.

3.2 Analyse des Effekts des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin auf die Denaturierung humaner Wildtyp-PAH

Sapropterindihydrochlorid wird seit einigen Jahren in der Behandlung der BH_4 -sensitiven PKU eingesetzt. Nach wie vor ist aber das Wissen um die Enzymfunktion und die Wirkungsweise des natürlichen Kofaktors in der Therapie nicht ausreichend geklärt. In den im Folgenden beschriebenen Untersuchungen wurde zunächst der Effekt von BH_4 auf die Denaturierung humaner Wildtyp-PAH analysiert. Alle Messungen wurden in drei voneinander

unabhängigen Experimenten durchgeführt. Die Proteine wurden aus Gateway®-Plasmiden exprimiert, aufgereinigt und mit Faktor Xa geschnitten.

3.2.1 Effekt von BH₄ auf das Entfaltungsmuster der Wildtyp-PAH im DSF-Assay

Um den Effekt von Tetrahydrobiopterin auf die Faltung des Enzyms im nativen Zustand sowie auf die Entfaltung ausgelöst durch thermischen Stress beurteilen zu können, wurde zunächst die Entfaltung des PAH-Wildtyps ohne und mit Zugabe des Kofaktors BH₄ im DSF-Assay analysiert.

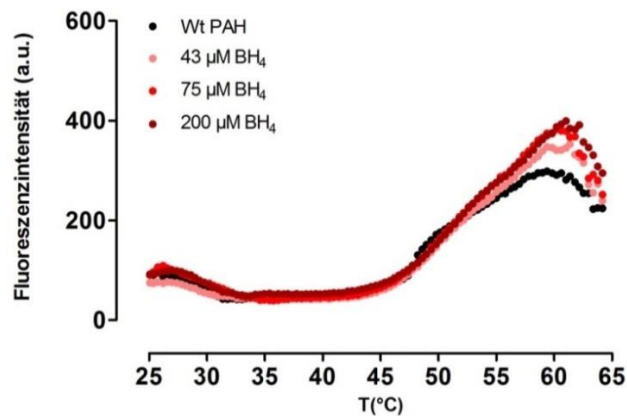


Abbildung 8: ANS-Fluoreszenzmessung des PAH-Wildtyps ohne BH₄ (schwarz) und unter Zugabe von BH₄ in unterschiedlichen Konzentrationen.

Abbildung 8 zeigt den Übergang des PAH-Wildtyps vom nativen Zustand zu Beginn der Messung bei 25°C in den denaturierten Zustand bei 65°C in Abhängigkeit von der Temperatur. Bei etwa 60°C erreicht die Fluoreszenzintensität ein Maximum und der PAH-Wildtyp liegt in gänzlich entfaltetem Zustand vor. Steigt die Temperatur weiter an, nimmt das Fluoreszenzsignal wieder ab. Dies spricht für eine zunehmende Aggregation des PAH-Wildtyps bei hohen Temperaturen.

Nach Zugabe von BH₄ in unterschiedlichen Konzentrationen kommt es zu einer leichten Rechtsverschiebung der Entfaltungskurve zu höheren Temperaturen. Die durchgeführten Messungen zeigen somit eine konzentrationsabhängige Stabilisierung der thermischen Entfaltung des PAH-Wildtyps durch Bindung des natürlichen Kofaktors BH₄.

	T _{m1/2}	ΔT _{m1/2} (°C)	T _{m2/3}	ΔT _{m2/3} (°C)
Wt PAH	47,74	-	54,99	-
Wt PAH + 43 µM BH₄	49,23	1,49	56,47	1,48
Wt PAH + 75 µM BH₄	49,13	1,39	57,35	2,36
Wt PAH + 200 µM BH₄	50,16	2,42	58,10	3,11

Tabelle 5: Vergleich der T_{m1/2} und T_{m2/3} Werte unter Zugabe von BH₄ in verschiedenen Konzentrationen.

3.2.2 Analyse der kinetischen Denaturierung des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH₄

Um zu untersuchen, wie sich BH₄ auf die Aktivierungsenergie der Entfaltung auswirkt, wurde zusätzlich zur thermischen Denaturierung auch eine kinetische Denaturierung durchgeführt.

Zunächst erfolgte die Denaturierung des PAH-Wildtyps ohne Kofaktoren. Als Temperaturstufen wurden in Abhängigkeit von der thermischen Entfaltungskurve 41,5°C, 43,0°C, 44,5°C, 46,0°C sowie 47,5°C gewählt. Die Messung wurde nach Eintreten einer Plateauphase beendet (Abbildung 9).

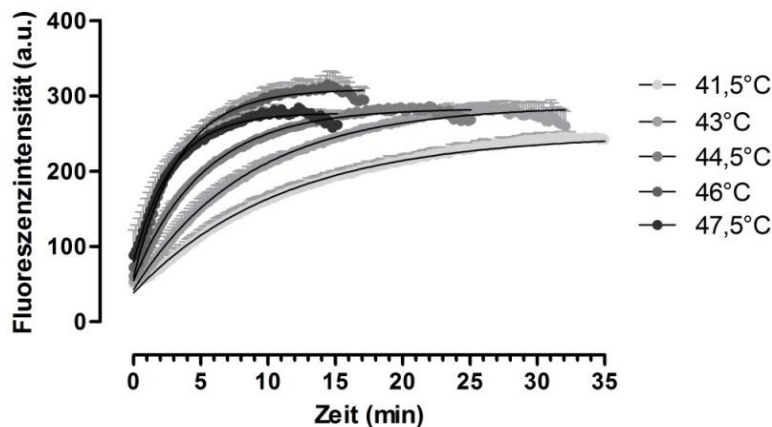


Abbildung 9: Kinetische Denaturierung des PAH-Wildtyps bei steigenden Temperaturen.

In einem nächsten Schritt wurde die Denaturierung des PAH-Wildtyps nach Zugabe von 43 µM BH₄ bei identischen Temperaturen analysiert (Abbildung 10).

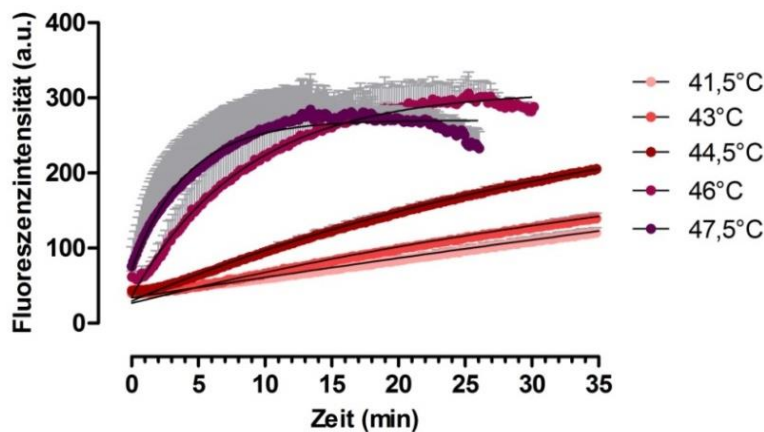


Abbildung 10: Kinetische Denaturierung des PAH-Wildtyps bei steigenden Temperaturen unter Zugabe von je 43 µM BH₄.

Die fünf Temperaturkurven zeigen, dass bei steigender Temperatur die vollständige Denaturierung des Proteins schneller eintritt, was an der bei höheren Temperaturen deutlich früher eintretenden Plateauphase zu erkennen ist. Bei Vergleich der beiden Abbildungen

lässt sich erkennen, dass nach Zugabe von BH_4 die Entfaltungskurven insgesamt flacher verlaufen und das Plateau bei der jeweiligen Temperatur erst zu einem späteren Zeitpunkt erreicht wird. Im Anschluss wurde die zeitabhängige Entfaltung des PAH-Wildtyps unter Zugabe von BH_4 in höheren Konzentrationen untersucht. Abb. 11 zeigt, dass die Konzentration des zugegebenen Kofaktors keine Auswirkung auf die Geschwindigkeit der Denaturierung hat, wie hier exemplarisch für die Temperatur von 43°C gezeigt. Während die Messung des PAH-Wildtyps ohne BH_4 bereits 32 Minuten nach Erreichen des Plateaus beendet werden konnte, verdreifachte BH_4 in allen eingesetzten Konzentrationen die Messzeit der kinetischen Denaturierung.

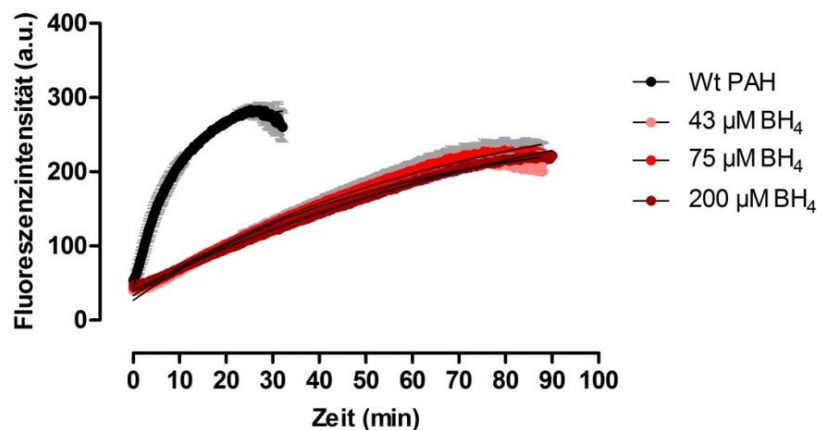


Abbildung 11: Kinetische Denaturierung des PAH-Wildtyps ohne BH_4 und nach Zugabe von BH_4 in drei unterschiedlichen Konzentrationen bei einer festgelegten Temperatur von 43°C .

3.2.3 Berechnung der Aktivierungsenergie

Mit Hilfe einer einphasigen Exponentialfunktion 1. Ordnung wurden die Geschwindigkeitskonstanten k aus den Kurven der zeitabhängigen Denaturierung für jede Temperatur nach folgender Formel berechnet und in Tabelle 6 aufgelistet.

$$Y = Y_0 + (\text{Plateau} - Y_0) \cdot (1 - \exp^{(-k \cdot x)})$$

Hierbei ist Y_0 ist der Schnittpunkt des Graphen mit der Y-Achse, x entspricht der Zeit.

T [$^\circ\text{C}$]	T [K]	k [Wt]	k [Wt + 43 μM BH_4]	k [Wt + 75 μM BH_4]	k [Wt + 200 μM BH_4]
41,5	314,65	0,0349	0,0147	0,0243	0,0410
43,0	316,15	0,0512	0,0309	0,0358	0,0629
44,5	317,65	0,0892	0,0568	0,0611	0,0881
46,0	319,15	0,1240	0,0753	0,0917	0,1144
47,5	320,65	0,1447	0,1604	0,1291	0,1673

Tabelle 6: Berechnete Geschwindigkeitskonstante k aus den Kurven der kinetischen Denaturierung über die einphasigen Assoziationsgleichung.

Um die auf den Geschwindigkeitskonstanten basierende Aktivierungsenergie zu berechnen, die es zu überwinden gilt, wenn das Enzym vom gefalteten, nativen Zustand in den entfalteten Zustand übergeht, wurde die Arrheniusgleichung verwendet.

Die Arrheniusgleichung lautet $k = A * e^{-\frac{E_A}{RT}}$.

Im Arrheniusplot wird dabei der natürliche Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante gegen den Kehrwert der Temperatur in Kelvin aufgetragen. So können die temperaturabhängigen Werte der Geschwindigkeitskonstanten auf einer Gerade abgebildet werden.

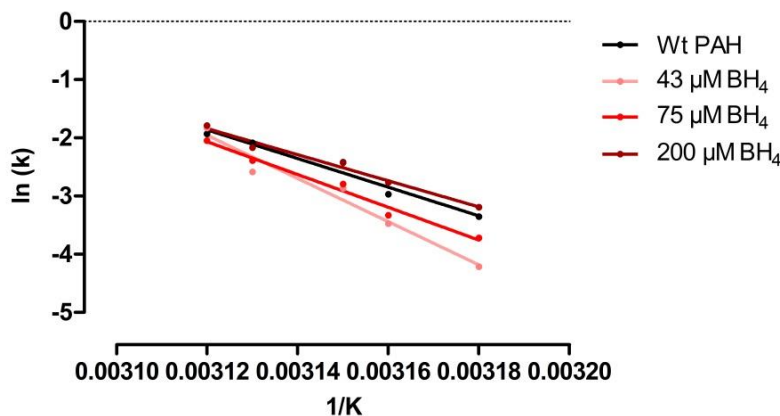


Abbildung 12: Der Arrheniusplot zeigt den linearen Zusammenhang zwischen dem natürlichen Logarithmus der Geschwindigkeitskonstante k und der reziproken Temperatur in Kelvin ($1/K$) für den PAH-Wildtyp ohne und mit BH_4 .

Über die Steigung m der Arrheniusgeraden ließ sich nun aus der Arrheniusgleichung die Aktivierungsenergie E_A in kJ/mol berechnen. $E_A = -m \times R$, wobei R die allgemeine Gaskonstante ist.

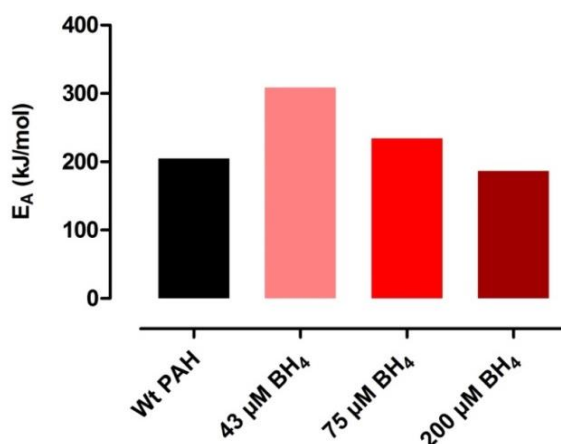


Abbildung 13: Die aus dem Arrheniusplot berechnete Aktivierungsenergie (E_A) des PAH-Wildtyps vor und nach Gabe von BH_4 in unterschiedlichen Konzentrationen.

Während für den PAH-Wildtyp eine Aktivierungsenergie von 204,70 kJ/mol berechnet wurde, kam es nach Zugabe von 43 μM BH_4 zu einem Anstieg der Aktivierungsenergie um etwa 50%. Mit steigenden BH_4 -Konzentrationen wurde dieser Effekt schwächer und bei einer BH_4 -Konzentration von 200 μM war die Aktivierungsenergie etwas niedriger als die des Wildtyps ohne BH_4 -Zugabe.

Das lässt vermuten, dass nur eine therapeutische BH_4 -Konzentration von 43 μM dazu in der Lage ist, den energetischen Übergang vom nativen, gefalteten Zustand des PAH-Wildtyps in den entfalteten Zustand zu erhöhen und somit das Enzym in seiner nativen Konformation zu stabilisieren. Bei Vorliegen des Kofaktors in einer höheren Konzentration konnte der stabilisierende Effekt nicht im selben Maß gezeigt werden.

	E_A [kJ/mol]	ΔE_A [kJ/mol]
Wt	204,70	-
Wt + 43 μM BH_4	308,55	103,85
Wt + 75 μM BH_4	234,22	29,52
Wt + 200 μM BH_4	186,49	-18,21

Tabelle 7: Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyp Proteins nach Gabe von BH_4 in steigenden Konzentrationen.

3.3 Analyse des Effekts des natürlichen Kofaktors BH_4 auf die Denaturierung ausgewählter Varianten der humanen PAH

Um den Effekt von BH_4 nicht nur auf den Wildtyp der PAH zu untersuchen, wurden zur weiteren Charakterisierung die PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H ausgewählt, deren Mutationen zu einem Aminosäureaustausch in jeweils in einer der drei Domänen der PAH führen. Alle drei Varianten zeigen phänotypisch eine relativ hohe Restaktivität (Y417H 76%, R68S 68% und R261Q 44%; www.biopku.org) und lösen im Patienten eine BH_4 -responsive Hyperphenylalaninämie aus.

3.3.1 Effekt von BH_4 auf das Entfaltungsmuster der PAH-Varianten im DSF-Assay

Auch bei den ausgewählten Varianten wurde eine durch Hitze induzierte Entfaltung der PAH ohne und mit Zugabe von BH_4 durchgeführt.

Abbildung 14 zeigt die Denaturierung von R68S vor und nach Zugabe unterschiedlicher BH_4 -Konzentrationen im DSF-Assay.

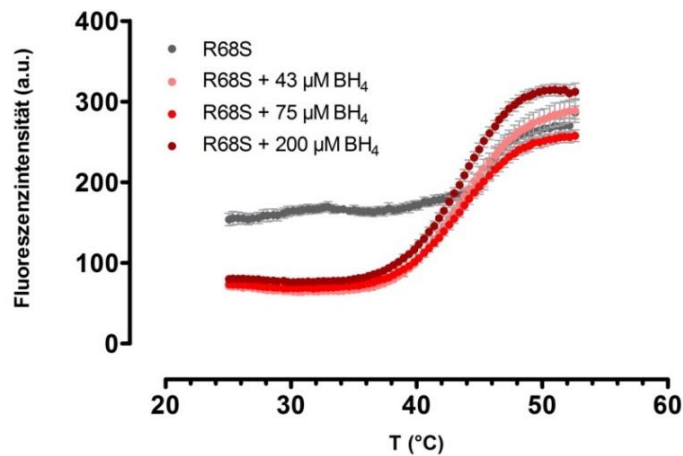


Abbildung 14: Temperaturabhängige Entfaltung der PAH-Variante R68S ohne Zugabe von BH_4 (grau) und nach Gabe von BH_4 in drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Wie beim PAH-Wildtyp waren auch hier zwei Temperaturübergänge zu erkennen, am deutlichsten sichtbar in der Entfaltungskurve von R68S ohne Zugabe des Kofaktors.

Die Variante R68S zeigte im nativen Zustand bei 25°C eine deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität im Vergleich zur Fluoreszenzintensität der Variante nach Zugabe von BH_4 . Zudem war der Anstieg des Fluoreszenzsignals von R68S ohne Zugabe des Kofaktors bei steigender Temperatur deutlich weniger stark ausgeprägt als bei der Entfaltungskurve von R68S im Komplex mit BH_4 . Die erhöhte Fluoreszenzintensität im nativen Zustand kann darauf hindeuten, dass die Variante R68S bereits im Grundzustand N-terminal partiell entfaltet vorliegt.

Die Analyse der Daten zeigte eine im Vergleich zu den weiteren Varianten weniger stark ausgeprägte, aber dennoch signifikante Rechtsverschiebung der Übergangstemperaturen nach Zugabe des Kofaktors.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	p-Wert	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)	p-Wert
R68S	40,89	-	-	46,23	-	-
+ 43 μM BH_4	43,06	2,17	< 0.0001	51,51	5,28	< 0.0001
+ 75 μM BH_4	42,90	2,01	< 0.0001	50,06	3,83	< 0.0001
+ 200 μM BH_4	42,84	1,95	< 0.0001	49,44	3,21	< 0.0001

Tabelle 8: Übergangstemperaturen des ersten ($T_{m1/2}$) und zweiten ($T_{m2/3}$) Übergangspunktes der Entfaltung von R68S vor und nach Zugabe von BH_4 .

Abbildung 15 zeigt die Entfaltung von R261Q im DSF-Assay mit und ohne Gabe von BH_4 .

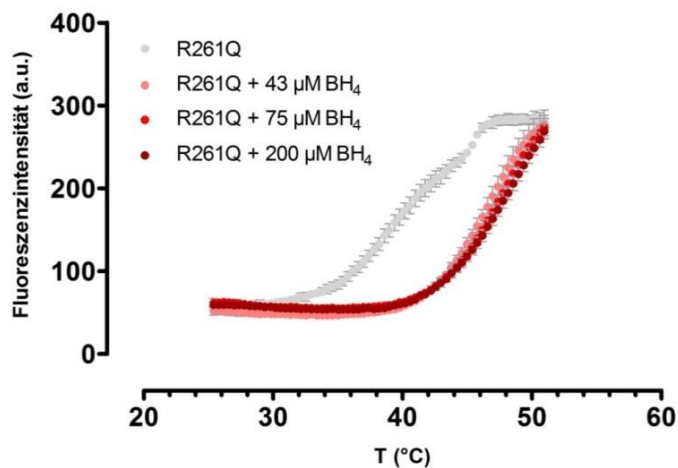


Abbildung 15: Temperaturabhängige Entfaltung der PAH-Variante R261Q ohne Zugabe von BH_4 (grau) und nach Gabe von BH_4 in drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Auch die Kurve von R261Q ohne Zugabe von BH_4 zeigte einen zweiphasigen Entfaltungsprozess. Bei dieser Variante führte die Zugabe von BH_4 in allen untersuchten Konzentrationen zu einer deutlichen Rechtsverschiebung der Entfaltungskurven, die zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Übergangstemperaturen $T_{m1/2}$ sowie $T_{m2/3}$ um jeweils mindestens $6,8^\circ\text{C}$ führte. Dies entspricht einer Stabilisierung des Proteins gegenüber Hitzestress.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2} (^\circ\text{C})$	p-Wert	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3} (^\circ\text{C})$	p-Wert
R261Q	38,32	-	-	45,13	-	-
+ 43 μM BH_4	45,11	6,79	< 0.0001	51,89	6,76	< 0.0001
+ 75 μM BH_4	46,13	7,81	< 0.0001	53,13	8,00	< 0.0001
+ 200 μM BH_4	46,84	8,52	< 0.0001	53,78	8,65	< 0.0001

Tabelle 9: Übergangstemperaturen des ersten ($T_{m1/2}$) und zweiten () Übergangspunktes der Entfaltung von R261Q vor und nach Zugabe von BH_4 .

Auch bei der Variante Y417H zeigten die Kurven nach Zugabe von BH_4 in allen untersuchten Konzentrationen eine statistisch signifikante Rechtsverschiebung.

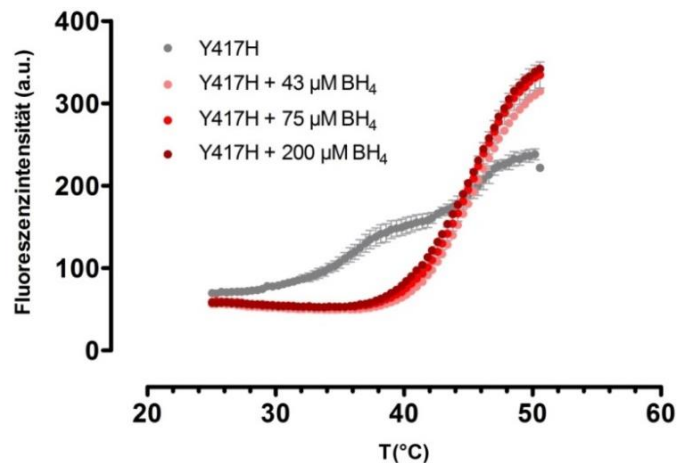


Abbildung 16: Temperaturabhängige Entfaltung der PAH-Variante Y417H ohne Zugabe von BH_4 (grau) und nach Gabe von BH_4 in drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Die Rechtsverschiebung zeigte sich vor allem im ersten Temperaturübergang und ist mit einer Entfaltung der regulatorischen Domäne erst bei höheren Temperaturen gleichzusetzen. Somit führte BH_4 auch zu einer Stabilisierung der Variante Y417H gegenüber Hitzestress. Innerhalb der verschiedenen BH_4 -Konzentrationen gab es keine deutlichen Unterschiede der Übergangstemperaturen.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	p-Wert	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)	p-Wert
Y417H	35,63	-	-	45,39	-	-
+ 43 μM BH_4	44,67	9,04	< 0.0001	51,47	6,08	0,0011
+ 75 μM BH_4	44,56	8,93	< 0.0001	51,36	5,97	0,0013
+ 200 μM BH_4	44,28	8,65	< 0.0001	50,70	5,31	0,0020

Tabelle 10: Übergangstemperaturen des ersten ($T_{m1/2}$) und zweiten ($T_{m2/3}$) Übergangspunktes der Entfaltung von Y417H mit und ohne Zugabe von BH_4 .

3.3.2 Vergleich der Hydrophobizität der PAH-Varianten im nativen Zustand

Um eine Aussage über die native Konformation des PAH-Wildtyps und seiner Varianten treffen zu können, wurden die Fluoreszenzintensitäten nach Zugabe von ANS im nativen Zustand, also bei einer Temperatur von 25°C analysiert. Hier fiel die deutlich erhöhte Fluoreszenzintensität der Varianten R68S auf, deren Mutation in der regulatorischen Domäne liegt.

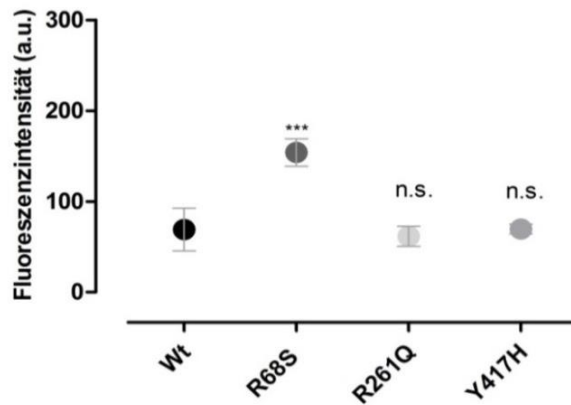


Abbildung 17: Vergleich der Hydrophobizität von WT und den Varianten R68S, R261Q und Y417H im nativen Zustand.

Um dieser interessanten Beobachtung weiter nachzugehen, wurde die Hydrophobizität von elf weiteren Varianten der PAH im Vergleich zum PAH-Wildtyp mittels ANS-Fluoreszenz analysiert. Beim Vergleich der Hydrophobizität im nativen Zustand von insgesamt fünf Varianten mit Mutation in der regulatorischen Domäne (F39L, F55L, I65S, I65T und R68S), vier Varianten mit Mutation in der katalytischen Domäne (R158Q, H170Q, R261Q und P314S) und zwei Varianten, deren Mutation in der Oligomerisierungsdomäne liegt (Y417C und Y414H), zeigte sich, dass es bei allen Varianten mit Mutation in der regulatorischen Domäne zu einer signifikanten Erhöhung der Hydrophobizität im nativen Zustand kommt.

Variante	Median (Fluoreszenz)	p-Wert (vs Wt)	Δ (vs WT)
Wt PAH	70,47		
F39L	159,10	< 0.0001 ***	88,63
F55L	96,72	0,0140 *	26,25
I65S	104,6	0,0040 **	34,13
I65T	102,7	0,0048 **	32,23
R68S	153,9	< 0.0001 ***	83,43
R158Q	69,39	0,9068	-1,08
H170Q	68,65	0,8434	-1,82
R261Q	61,57	0,3051	-8,9
P314S	65,21	0,5737	-5,26
Y417C	78,17	0,4363	7,7
Y417H	69,63	0,9171	-0,84

Tabelle 11: Vergleich der Fluoreszenzintensität verschiedener PAH Varianten und des PAH-Wildtyps im Nativzustand.

Die Veränderung der Fluoreszenzintensität der Varianten, deren Mutation in der regulatorischen Dömane liegt, wird im Folgenden exemplarisch an der Varianten R68S

dargestellt. Die Erhöhung der Fluoreszenzintensität im Nativzustand war für die Variante R68S bereits in der Analyse der DSF-Daten aufgefallen. Nach Zugabe des Kofaktors BH_4 zur Variante R68S kam es zu einem Absinken der Fluoreszenzintensität im Nativzustand.

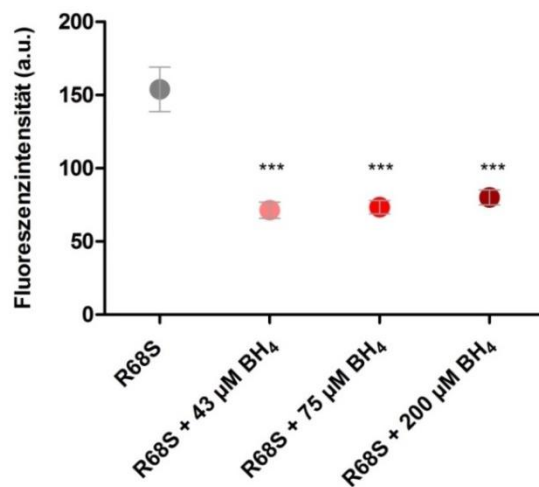


Abbildung 18: Vergleich der Fluoreszenzintensitäten von R68S im nativen Zustand vor und nach Zugabe von BH_4 in drei unterschiedlichen Konzentrationen.

Die erhöhte Fluoreszenzintensität von R68S ohne gebundenen Kofaktor deutet darauf hin, dass das Protein bereits in seinem nativen Zustand partiell entfaltet vorliegt, da mehr hydrophobe Seitenketten für die Bindung des Fluoreszenzfarbstoffs ANS zur Verfügung stehen. Nach Zugabe des Kofaktors BH_4 in steigenden Konzentrationen kommt es zu einer statistisch signifikanten Abnahme der Fluoreszenzintensität und damit der Hydrophobizität der Varianten im Nativzustand. Dies spricht für eine kompaktere Konformation und somit höhere Stabilität des varianten Enzyms im Komplex mit dem Kofaktor.

	Median (Fluoreszenz a.u.)	p-Wert (vs R68S)	Δ (vs R68S)
R68S	153,9	-	-
R68S + 43 µM BH_4	71,38	0,0003	82,53
R68S + 75 µM BH_4	73,41	0,0003	80,49
R68S + 200 µM BH_4	80,05	0,0005	73,85

Tabelle 12: Fluoreszenzintensitäten von R68S im nativen Zustand.

3.3.3 Analyse der kinetischen Denaturierung der PAH-Varianten im Komplex mit BH_4

Auch bei den ausgewählten Varianten wurde die zeitabhängige Entfaltung, also die Denaturierung bei einer festgelegten Temperatur über einen definierten Zeitraum, untersucht. Alle Messungen wurden je dreimal bei fünf unterschiedlichen Temperaturen von 38,0°C bis 46,0°C (R261Q und Y417H) resp. 41,5°C bis 47,5°C (R68S) durchgeführt. Diese

Temperaturen wurden nach Berechnung der T_m -Werte aus der thermischen Proteindenaturierung gewählt.

Abbildung 19 zeigt die kinetische Denaturierung der Varianten R68S.

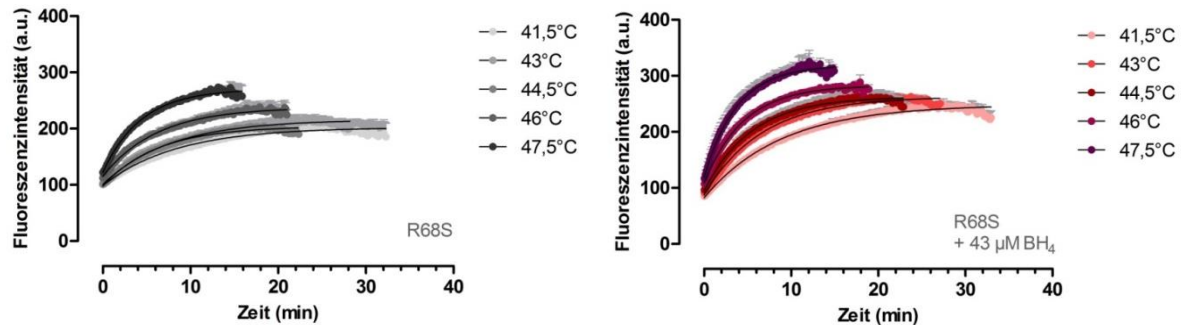


Abbildung 19: Zeitabhängige Denaturierung der PAH-Variante R68S vor und nach Zugabe von 43 µM BH₄ über den Zeitraum von maximal 40 Minuten. Mit Anzeichen für eine Aggregation des Proteins in der Denaturierungskurve wurde die Messung beendet.

Der Zeitpunkt der vollständigen Proteindenaturierung kann mit Eintreten der Plateauphase in der Entfaltungskurve festgelegt werden. Dieses Plateau wird wie erwartet bei R68S ohne und nach Zugabe des Kofaktors BH₄ mit ansteigenden Temperaturen schneller erreicht. Nach Zugabe von BH₄ veränderte sich der Kurvenverlauf allerdings nur unwesentlich, was darauf hindeutet, dass BH₄ kaum Einfluss auf die zeitabhängige Entfaltung der Variante R68S hat. Um dies zu verdeutlichen, wurde die Denaturierung von R68S ohne und mit 43 µM BH₄ bei einer beispielhaft ausgewählten Temperatur von 43°C direkt verglichen. Hier ist ein ähnlicher Kurvenverlauf mit einer etwas stärkeren Fluoreszenzintensität von R68S im Komplex mit BH₄ zu erkennen. Die Plateauphase tritt sowohl ohne als auch mit Gabe von BH₄ nach etwa 21 Minuten ein.

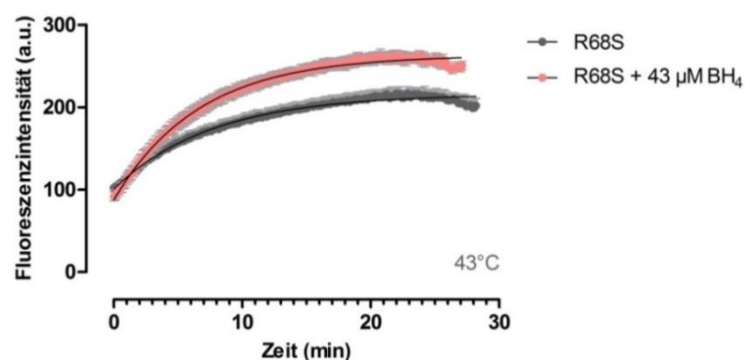


Abbildung 20: Zeitabhängige Denaturierung der Variante R68S vor und nach Zugabe von 43 µM BH₄ bei einer Temperatur von 43°C.

Für die kinetische Denaturierung der Variante R261Q wurden Temperaturstufen zwischen 38,0° und 46°C gewählt.

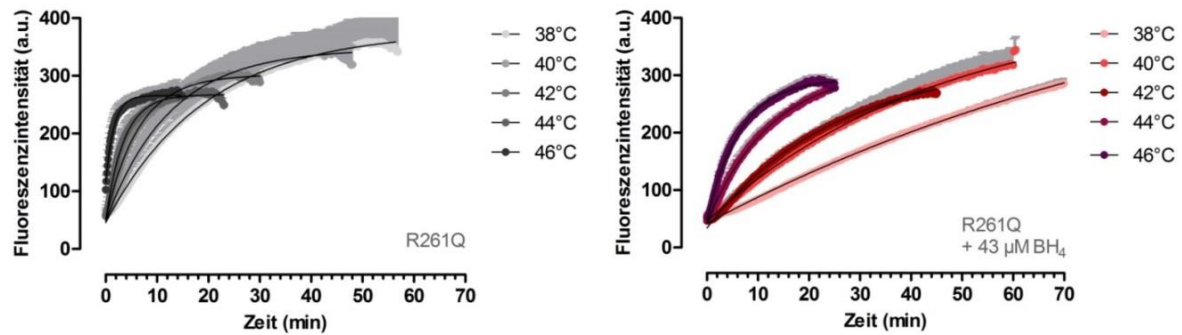


Abbildung 21: Zeitabhängige Denaturierung der PAH-Variante R261Q vor und nach Zugabe von 43 μM BH_4 über den Zeitraum von maximal 70 Minuten.

Sowohl bei der Untersuchung von R261Q ohne Kofaktor als auch bei der Untersuchung nach Zugabe des Kofaktors trat die vollständige Entfaltung erwartungsgemäß bei höheren Temperaturen schneller ein, erkennbar am Zeitpunkt des Erreichens der Plateauphase. Das Plateau wurde bei Erwärmung auf 46°C schon nach wenigen Minuten erreicht, bei der Temperatur von 38°C hingegen nach etwa einer Stunde. Nach Zugabe des Kofaktors BH_4 war der Kurvenverlauf vor allem bei niedrigeren Temperaturen sichtbar flacher, gezeigt durch den direkten Vergleich von R261Q vor und nach Zugabe von 43 μM BH_4 bei einer beispielhaft gewählten Temperatur von 42°C.

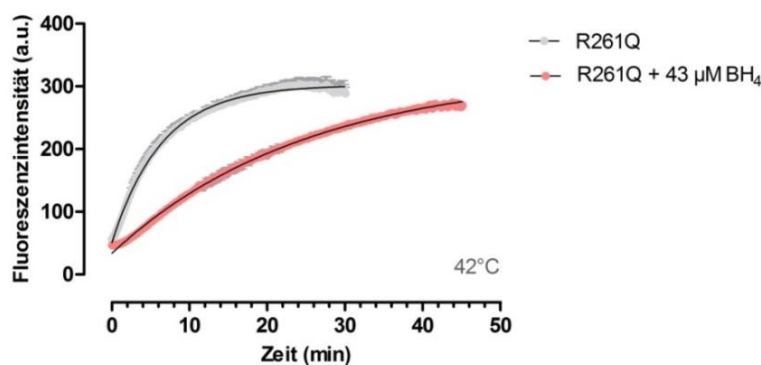


Abbildung 22: Zeitabhängige Denaturierung der Variante R261Q vor und nach Zugabe von 43 μM BH_4 bei einer Temperatur von 42°C.

Die kinetische Denaturierung der Variante Y417H wurde ohne und nach Zugabe des Kofaktors BH_4 ebenfalls in Temperaturstufen zwischen 38,0°C und 46,0°C durchgeführt.

Der Vergleich der Denaturierungskurven zeigt, dass die Kurve nach Zugabe von BH_4 flacher verläuft und das Plateau erst zu einem deutlich späteren Zeitpunkt erreicht.

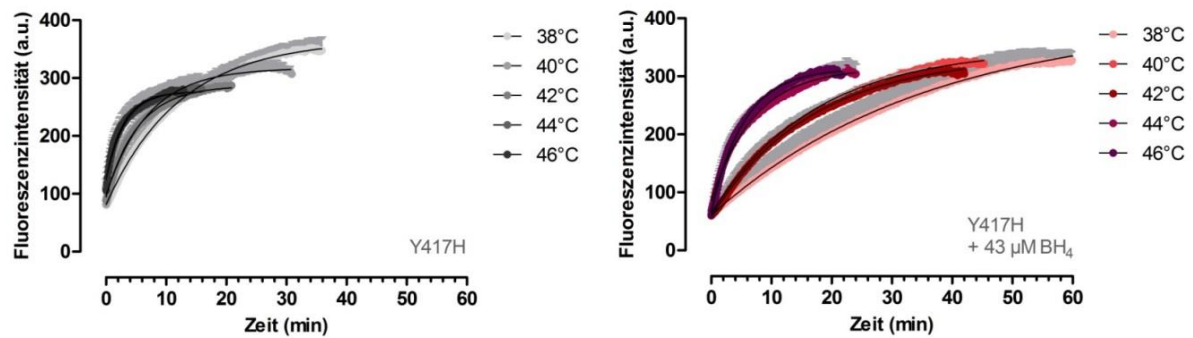


Abbildung 23: Zeitabhängige Denaturierung der PAH-Variante Y417H vor und nach Zugabe von 43 μM BH_4 über den Zeitraum von maximal 60 Minuten.

Auch bei der Varianten Y417H wurde das Plateau ohne Zugabe des Kofaktors BH_4 nach deutlich kürzerer Zeit erreicht.

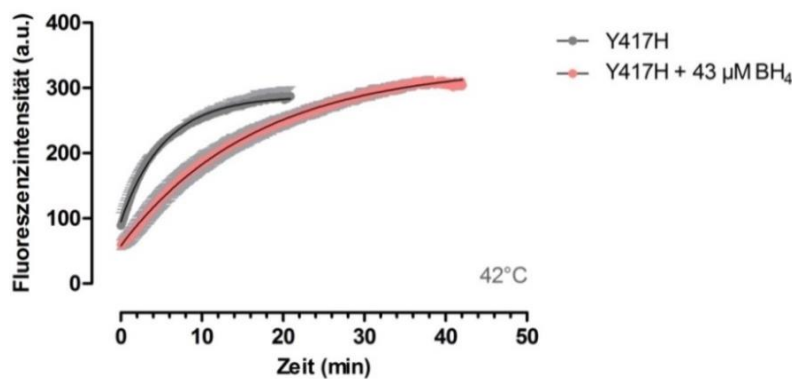


Abbildung 24: Kinetische Denaturierung der PAH-Variante Y417H vor und nach Zugabe von 43 μM BH_4 bei einer Temperatur von 42 °C.

3.3.4 Berechnung der Aktivierungsenergien

Zunächst wurden über die einphasige Assoziationsgleichung die Geschwindigkeitskonstanten k berechnet. Diese Geschwindigkeitskonstanten k wurden als Arrheniusplot $\ln(k)$ gegen $1/K$ aufgetragen. So konnten über die Arrheniusgleichung anhand der Steigungen der Geraden die Aktivierungsenergien (E_A) der Varianten vor und nach Zugabe des Kofaktors berechnet werden.

	Temperatur (K)	k
R68S	314,65	0,0471
	316,15	0,0580
	317,65	0,0725
	319,15	0,0683
	320,65	0,0621

R68S + 43 μM BH₄	314,65	0,1920
	316,15	0,1856
	317,65	0,2503
	319,15	0,3014
	320,65	0,3367
R261Q	311,15	0,0280
	313,15	0,0480
	315,15	0,1033
	317,15	0,1956
	319,15	0,2458
R261Q + 43 μM BH₄	311,15	0,0238
	313,15	0,0535
	315,15	0,0812
	317,15	0,1781
	319,15	0,2463
Y417H	311,15	0,0342
	313,15	0,0598
	315,15	0,0789
	317,15	0,1096
	319,15	0,0945
Y417H + 43 μM BH₄	311,15	0,0478
	313,15	0,0828
	315,15	0,1148
	317,15	0,2428
	319,15	0,3037

Tabelle 13: Berechnete Geschwindigkeitskonstante k aus den Kurven der kinetischen Denaturierung über die einphasigen Assoziationsgleichung.

Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung des Kofaktors BH₄ zu einem Anstieg der Aktivierungsenergie der Varianten führt. Für R68S erfolgte eine Zunahme um Faktor 1,5, für Y417H um Faktor 1,3 und für R261Q war die Zunahme am geringsten ausgeprägt (Faktor 1,1).

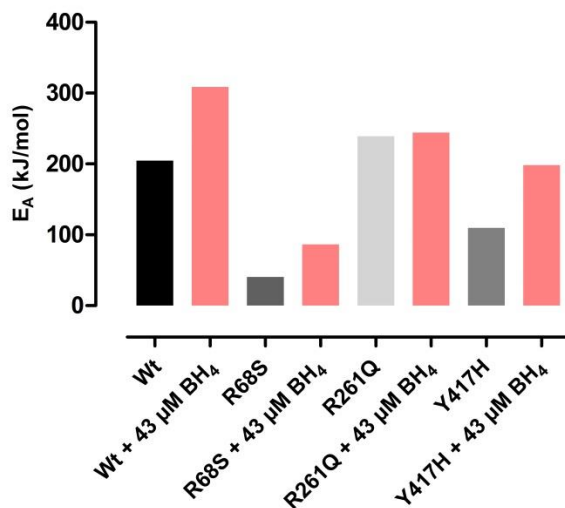


Abbildung 25: Vergleich der Aktivierungsenergien (E_A) des PAH-Wildtyps und der PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H vor und nach Gabe des Kofaktors BH_4 .

	E_A (kJ/mol)	ΔE_A (kJ/mol)
Wt	204,70	-
Wt + 43 μM BH_4	308,55	103,85
R261Q	259,33	-
R261Q + 43 μM BH_4	285,60	26,27
R68S	79,94	-
R68S + 43 μM BH_4	115,99	36,05
Y417H	153,82	-
Y417H + 43 μM BH_4	192,15	38,33

Tabelle 14: Aktivierungsenergien (E_A) des PAH-Wildtyps und der PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H vor und nach Gabe des Kofaktors BH_4 . Die ΔE_A ist immer in Bezug auf die jeweilige PAH-Variante vor Gabe des Kofaktors angegeben.

3.4 Analyse des Einflusses von BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die Denaturierung des humanen PAH-Wildtyp-Proteins

In den bisher beschriebenen Untersuchungen wurden die Auswirkungen des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin auf den PAH-Wildtyp sowie auf ausgewählte Varianten der PAH untersucht.

In den folgenden Experimenten wurde unter Anwendung derselben Methoden der Effekt der BH_4 -Derivate BH_2 und Sepiapterin sowie des synthetischen Kofaktanalogons 6-MPH₄ auf den PAH-Wildtyp analysiert. Ziel war zu analysieren, welchen Einfluss das PterinGrundgerüst und die Seitenkette des natürlichen Kofaktors BH_4 auf dessen stabilisierenden Effekt haben.

3.4.1 Analyse des Einflusses von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die thermische Stabilität des PAH-Wildtyps

Zunächst wurde die Denaturierung des PAH-Wildtyps nach Zugabe von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ untersucht und die Entfaltungskurven mit der nach Bindung von BH₄ verglichen.

Die Analyse der thermischen Proteindenaturierung nach Zugabe von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ zeigte einen temperaturabhängigen Anstieg der Fluoreszenzintensität.

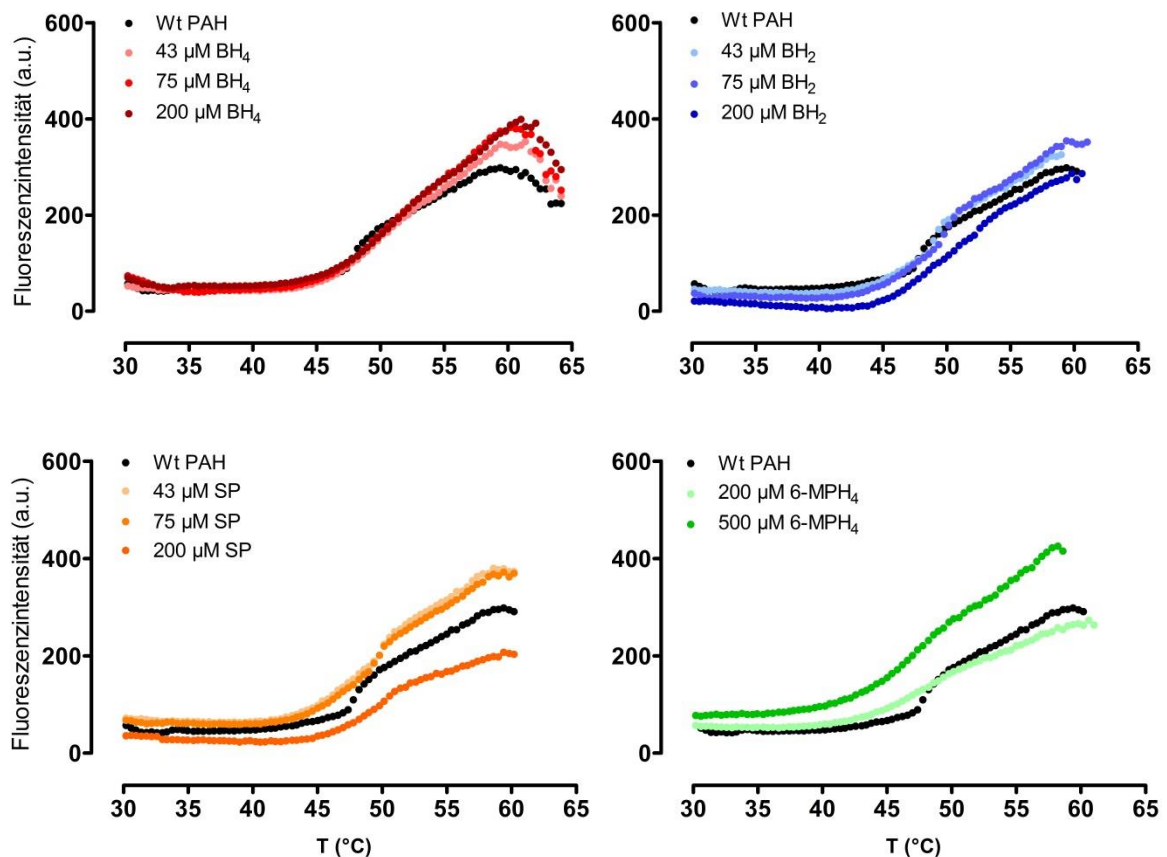


Abbildung 26: Thermische Denaturierung des PAH-Wildtyps vor (schwarz) und nach Zugabe der Kofaktoren BH₄ (rot), BH₂ (blau), Sepiapterin (orange) und 6-MPH₄ (grün) in unterschiedlichen Konzentrationen.

Nach Zugabe von BH₄ kam es bei allen untersuchten Konzentrationen zu einer gering ausgeprägten Rechtsverschiebung der Entfaltungskurve, die mit einer leichten Stabilisierung des Proteins gegen Hitzestress zu erklären ist. Ein ähnlicher, aber etwas geringer ausgeprägter Effekt war nach Zugabe des oxidierten Kofaktors BH₂ zu erkennen. Die Zugabe von geringen Sepiapterinkonzentrationen zum PAH-Wildtyp zeigte nahezu keinen Effekt auf die Proteindenaturierung, die T_m-Werte variierten minimal im Vergleich zu denen des PAH-Wildtyp-Proteins ohne Zugabe des Kofaktors. Erst eine höhere Dosis von 200 µM führte zur Stabilisierung des Proteins gegen Hitzestress. Nach Zugabe von 6-MPH₄ kam es

zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion der $T_{m1/2}$ -Werte, die mit einer Destabilisierung der regulatorischen Domäne des PAH-Wildtyps im Komplex mit 6-MPH₄ einhergehen. Der 2. Umschlagpunkt konnte hingegen mit niedrigen 6-MPH₄-Konzentrationen stabilisiert werden.

	$T_{m1/2}$ (°C)	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	$T_{m2/3}$ (°C)	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)
Wt	47,74	-	54,99	-
Wt + 43 μ M BH ₄	49,23	1,49	56,47	1,48
Wt + 75 μ M BH ₄	49,13	1,39	57,37	2,38
Wt + 200 μ M BH ₄	50,16	2,42	58,10	3,11
Wt + 43 μ M BH ₂	48,77	1,03	56,41	1,42
Wt + 75 μ M BH ₂	48,49	0,75	56,74	1,75
Wt + 200 μ M BH ₂	49,88	2,14	56,74	1,75
Wt + 43 μ M SP	48,06	0,32	54,65	-0,34
Wt + 75 μ M SP	47,88	0,14	54,26	-0,73
Wt + 200 μ M SP	48,71	0,97	56,11	1,12
Wt + 200 μ M 6-MPH ₄	47,5	-0,56	56,09	1,10
Wt + 500 μ M 6-MPH ₄	46,38	-1,36	55,35	0,36
Wt + 1000 μ M 6-MPH ₄	39,45	-8,29	n.b.	n.b.

Tabelle 15: Übergangstemperaturen $T_{m1/2}$ sowie $T_{m2/3}$ für den Wildtyp unter Zugabe von BH₄, BH₂, Sepiapterin (SP) und 6-MPH₄. $\Delta T_{m1/2}$ und $\Delta T_{m2/3}$ zeigen den Temperaturunterschied im Vergleich zum Wildtyp ohne Zugabe eines Kofaktors.

3.4.2 Vergleich der Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps im Komplex mit BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄

Für die Kofaktoren BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ wurden ebenfalls zeitabhängige Denaturierungen durchgeführt. Im Anschluss wurden die Daten der kinetischen Denaturierung im Arrheniusplot aufgetragen. Aus den Steigungen der Geraden wurden die Aktivierungsenergien berechnet und mit der des PAH-Wildtyps mit und ohne Zugabe von BH₄ verglichen.

Die Zugabe des Kofaktors BH₄ führte nur in der Konzentration von 43 μ M, also in der therapeutischen Dosis, zu einem deutlich steileren Verlauf der Geraden. Daher wurden im Rahmen dieser Doktorarbeit auch nur die therapeutischen Konzentrationen von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ untersucht und mit BH₄ verglichen.

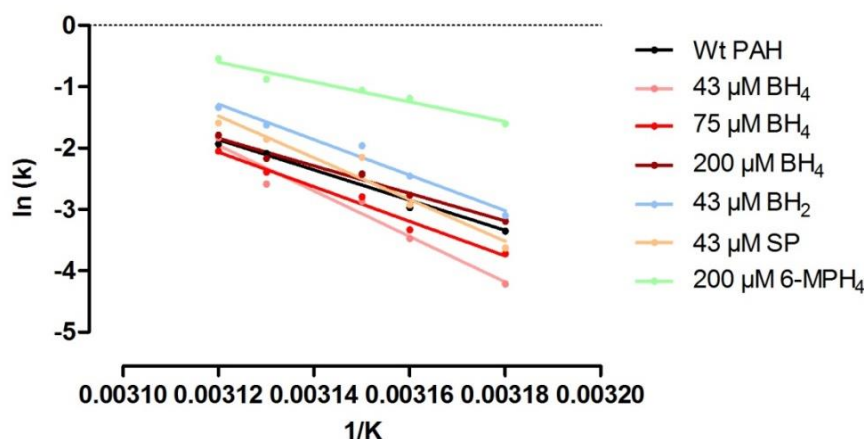


Abbildung 27: Arrheniusplot des PAH-Wildtyps ohne Kofaktor und im Komplex mit BH_4 , BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄.

Einen ähnlichen Effekt wie nach der Zugabe von 43 μM BH_4 zeigten von den weiteren untersuchten Kofaktoren nur BH_2 und Sepiapterin, denn die Steigung dieser Geraden ist nur geringfügig flacher als die der Geraden nach Zugabe von 43 μM BH_4 . Im Gegensatz dazu ist die Steigung der Geraden nach Zugabe von 6-MPH₄ vergleichbar mit der des PAH-Wildtyps ohne BH_4 .

Aus den Geradensteigungen wurden über die Arrheniusgleichung die Aktivierungsenergien für den PAH-Wildtyp im Komplex mit dem jeweiligen Kofaktor berechnet. Die Aktivierungsenergie nach Zugabe von 43 μM BH_4 war mit 308,55 kJ/mol die höchste. Auch die Zugabe von Sepiapterin steigerte die Aktivierungsenergie des PAH-Wildtyps von 204,70 kJ/mol auf 282,76 kJ/mol um 38%. BH_2 führte dagegen nur zu einer leichten Erhöhung der Aktivierungsenergie, während die Zugabe von 6-MPH₄ zu einer deutlichen Erniedrigung der Aktivierungsenergie um 34% führte.

	E_A (kJ/mol)	ΔE_A (kJ/mol)
Wt PAH	204,70	
Wt + 43 μM BH_4	308,55	103,85
Wt + 75 μM BH_4	234,22	29,52
Wt + 200 μM BH_4	186,49	-18,21
Wt + 43 μM BH_2	240,51	35,81
Wt + 43 μM SP	282,76	78,06
Wt + 200 μM 6-MPH ₄	134,09	-70,61

Tabelle 16: Aktivierungsenergien nach Zugabe der verschiedenen Kofaktoren im Vergleich zum PAH-Wildtyp ohne Zugabe eines Kofaktors.

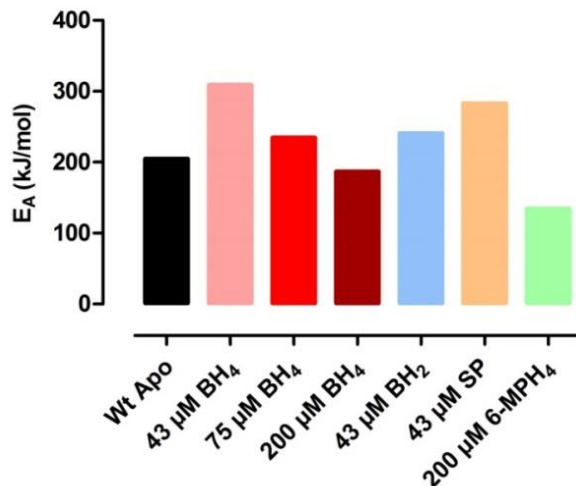


Abbildung 28: Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps ohne Kofaktor sowie nach Zugabe von BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄.

3.5 Analyse des Einflusses von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die thermische Denaturierung ausgewählter Varianten der PAH

Der Einfluss der BH₄-Derivate BH₂ und Sepiapterin sowie des synthetischen Kofaktoranalogs 6-MPH₄ wurde auch für die Varianten R68S, R261Q und Y417H untersucht.

3.5.1 Analyse des Einflusses von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die thermische Stabilität der PAH-Varianten

Die thermische Denaturierung der Varianten R68S, R261Q und Y417H nach Zugabe der alternativen Kofaktoren wurde mit den Entfaltungskurven nach Zugabe von BH₄ verglichen. Abbildung 29 zeigt die Entfaltungskurven der thermischen Denaturierung der gewählten Varianten nach Zugabe von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ im Vergleich.

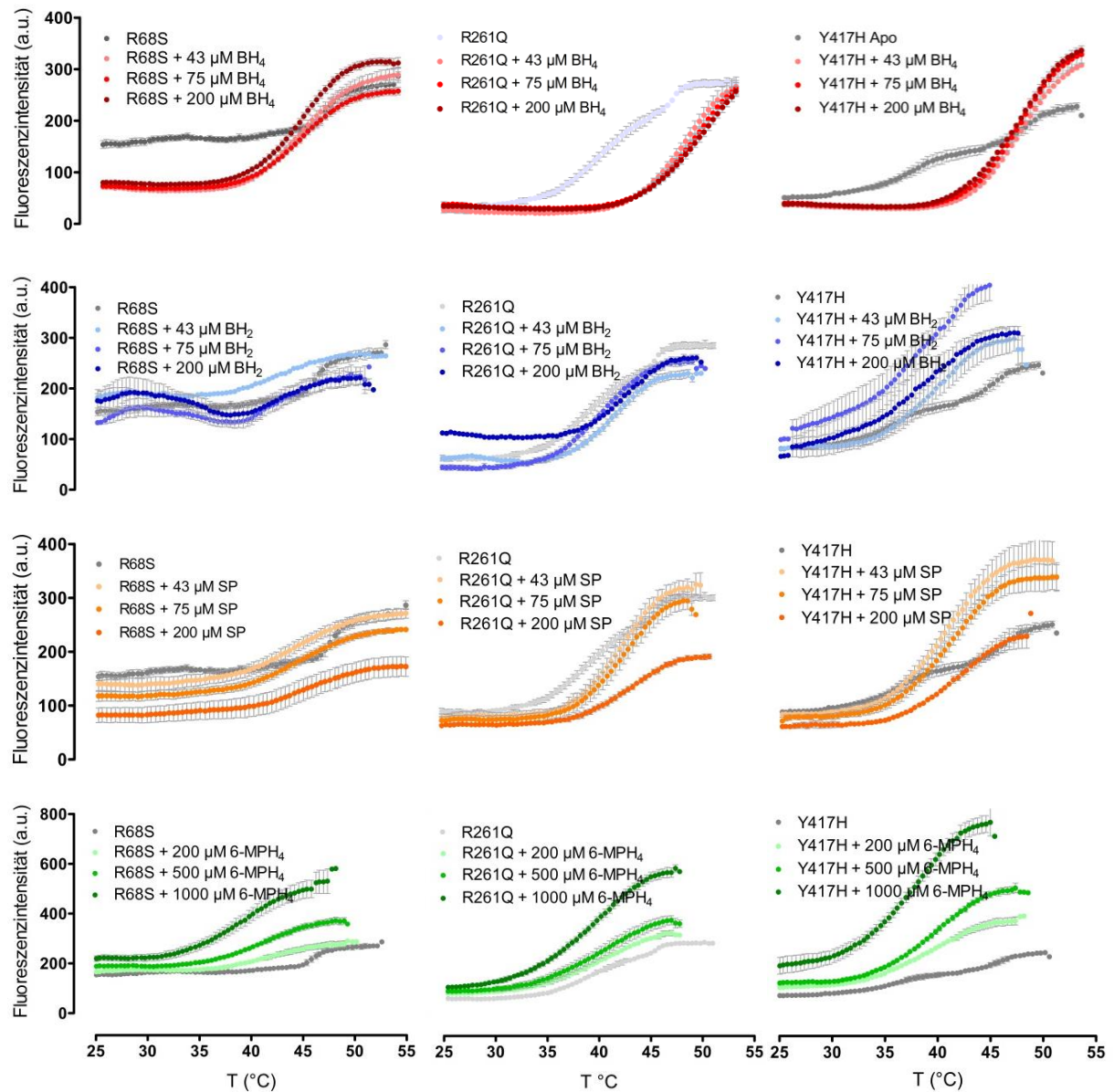


Abbildung 29: Thermische Denaturierung der PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H vor (Graustufen) und nach Zugabe der Kofaktoren BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ in unterschiedlichen Konzentrationen.

Der Effekt des Kofaktors BH₄ auf die thermische Entfaltung der Variante R68S wurde bereits dargestellt. Die Stabilisierung der Entfaltung der regulatorischen Domäne ($T_{m1/2}$) und der katalytische Domäne ($T_{m2/3}$) nach Zugabe des Kofaktors BH₄ war für alle untersuchten Konzentrationen statistisch signifikant. Der Effekt der BH₄-Derivate BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ auf die PAH-Variante R68S zeigte insgesamt eine deutlich geringer ausgeprägte Rechtsverschiebung bzw. Stabilisierung der Denaturierungskurven. Lediglich die Zugabe von 200 μ M BH₂ konnte im ersten Temperaturübergang eine signifikante Rechtsverschiebung um

1,53 °C im Vergleich zu R68S ohne Zugabe eines Kofaktors bewirken und sich somit stabilisierend auf die Entfaltung der regulatorischen Domäne auswirken.

Während nach Zugabe von Sepiapterin im ersten Temperaturübergang mit keiner der eingesetzten Konzentrationen ein Effekt zu beobachten war, erfolgte eine signifikante Stabilisierung aller $T_{m2/3}$ -Werte von R68S im Komplex mit Sepiapterin. 6-MPH₄ führte in allen untersuchten Konzentrationen zu einer konzentrationsabhängigen Linksverschiebung der Entfaltungskurven und damit zu einer Destabilisierung der Variante bei Hitzestress.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	p-Wert	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)	p-Wert
R68S	40,89	-	-	46,23	-	-
R68S + 43 μM BH₄	43,06	2,17	< 0.0001	51,51	5,28	< 0.0001
R68S + 75 μM BH₄	42,90	2,01	< 0.0001	50,06	3,83	< 0.0001
R68S + 200 μM BH₄	42,84	1,95	< 0.0001	49,44	3,21	< 0.0001
R68S + 43 μM BH₂	41,33	0,44	0,1314	48,26	2,03	0,0009
R68S + 75 μM BH₂	41,58	0,69	0,0155	47,41	1,18	0,0063
R68S + 200 μM BH₂	42,42	1,53	< 0.0001	47,80	1,57	0,0042
R68S + 43 μM SP	40,89	0,01	0,9670	50,38	4,15	< 0.0001
R68S + 75 μM SP	41,25	0,36	0,0503	50,13	3,90	< 0.0001
R68S + 200 μM SP	40,98	0,09	0,8361	50,02	3,79	< 0.0001
R68S + 200 μM 6-MPH₄	40,35	-0,54	0,0356	46,50	0,27	0,5253
R68S + 500 μM 6-MPH₄	39,53	-1,36	0,0010	46,50	0,27	0,4060
R68S + 1000 μM 6-MPH₄	37,75	-3,14	< 0.0001	44,57	-1,66	0,0176

Tabelle 17: Übergangstemperaturen $T_{m1/2}$ sowie $T_{m2/3}$ für R68S unter Zugabe von BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄. $\Delta T_{m1/2}$ und $\Delta T_{m2/3}$ zeigen den Temperaturunterschied im Vergleich zu R68S ohne Zugabe eines Kofaktors.

Eine in Kapitel 3.3.2 bereits beschriebene Besonderheit der Variante R68S war die signifikante Abnahme der Fluoreszenzintensität im nativen Zustand durch Bindung des Kofaktors BH₄. Einen vergleichbaren Effekt erzielte bei den untersuchten BH₄-Derivaten lediglich Sepiapterin, am deutlichsten in der Konzentration von 200 μ M. BH₂ in einer Konzentration von 43 μ M sowie 6-MPH₄ in den Konzentrationen von 500 bzw. 1000 μ M führten zu einer Zunahme der Hydrophobizität. Diese geht vermutlich mit konformativen Änderungen einher, die die im DSF-Assay beobachtete Destabilisierung vor allem der regulatorischen Domänen von R68S erklären könnte. BH₂ in höheren Konzentrationen sowie 200 μ M 6-MPH₄ zeigten keine signifikante Veränderung der Hydrophobizität von R68S im nativen Zustand.

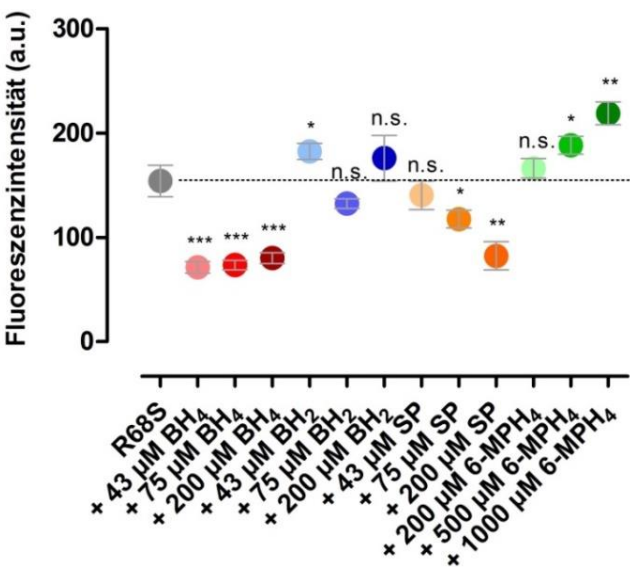


Abbildung 30: Vergleich der Hydrophobizität von R68S im nativen Zustand und im Komplexzustand mit BH₄ und seinen Derivaten.

Der Kofaktor BH₄ bewirkte bei der PAH-Variante R261Q eine Verschiebung der T_m-Werte zu höheren Temperaturen. In der Untersuchung mit den drei Kofaktoren Sepiapterin, BH₂ und 6-MPH₄ zeigte Sepiapterin den deutlichsten Effekt, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie der von BH₄.

	T _{m1/2}	ΔT _{m1/2} (°C)	p-Wert	T _{m2/3}	ΔT _{m2/3} (°C)	p-Wert
R261Q	38,32	-	-	45,13	-	-
R261Q + 43 μM BH ₄	45,11	6,79	< 0.0001	51,89	6,76	< 0.0001
R261Q + 75 μM BH ₄	46,13	7,81	< 0.0001	53,13	8,00	< 0.0001
R261Q + 200 μM BH ₄	46,84	8,52	< 0.0001	53,78	8,65	< 0.0001
R261Q + 43 μM BH ₂	40,48	2,16	0,0010	46,09	0,96	0,1101
R261Q + 75 μM BH ₂	38,97	0,65	0,0539	45,80	0,67	0,2572
R261Q + 200 μM BH ₂	40,45	2,13	0,0004	46,47	1,34	0,0492
R261Q + 43 μM SP	40,96	2,64	0,0003	46,98	1,85	0,0155
R261Q + 75 μM SP	40,71	2,39	0,0003	46,50	1,37	0,0430
R261Q + 200 μM SP	41,40	3,08	0,0003	47,87	2,74	0,0030
R261Q + 200 μM 6-MPH ₄	37,99	-0,33	0,3909	45,27	0,14	0,7945
R261Q + 500 μM 6-MPH ₄	38,35	0,03	0,9345	45,31	0,18	0,7600
R261Q + 1000 μM 6-MPH ₄	37,49	-0,83	0,0511	44,42	-0,71	0,2523

Tabelle 18: Übergangstemperaturen T_{m1/2} sowie T_{m2/3} für R261Q unter Zugabe von BH₄, BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄. ΔT_{m1/2} und ΔT_{m2/3} zeigen den Temperaturunterschied im Vergleich zu R261Q ohne Zugabe eines Kofaktors.

Der $T_{m1/2}$ -Wert, und damit die Entfaltung der regulatorischen Domänen, wurde um bis zu 3,1°C stabilisiert, $T_{m2/3}$, also die Entfaltung der katalytischen Domänen, um bis zu 2,7°C. BH_2 wirkte sich vor allem auf den ersten Temperaturübergang stabilisierend aus, im zweiten Temperaturübergang war diese Stabilisierung nur bei einer BH_2 -Konzentration von 200 μM statistisch signifikant. 6-MPH₄ zeigte bis auf eine stärkere Zunahme der Fluoreszenzintensität mit zunehmender Temperatur keinen signifikanten Effekt auf die Übergangstemperaturen.

Auch bei der Variante Y417H wurde durch den Kofaktor BH_4 eine signifikante Rechtsverschiebung und damit Stabilisierung der Entfaltungskurve im ersten und zweiten Temperaturübergang induziert. Die alternativen Kofaktoren BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄ wirkten sich insgesamt stabilisierend auf den ersten Temperaturübergang aus, wenn auch nicht so deutlich wie es mit BH_4 der Fall war. Durch die höchste Sepiapterinkonzentration von 200 μM konnte eine Stabilisierung um 3,6°C gemessen werden. Im zweiten Temperaturübergang konnte bei keinem der untersuchten Kofaktoren ein signifikanter Effekt nachgewiesen werden. Das heißt, die untersuchten BH_4 -Derivate üben ihre stabilisierende Wirkung vorzugsweise auf die regulatorischen Domänen von Y417H aus.

Y417H	35,63	-	-	45,39	-	-
Y417H + 43 μM BH_4	44,67	9,04	< 0.0001	51,47	6,08	0,0011
Y417H + 75 μM BH_4	44,56	8,93	< 0.0001	51,36	5,97	0,0013
Y417H + 200 μM BH_4	44,28	8,65	< 0.0001	50,70	5,31	0,0020
Y417H + 43 μM BH_2	37,71	2,08	0,0201	45,43	0,04	0,9652
Y417H + 75 μM BH_2	36,84	1,21	0,0283	44,63	-0,76	0,4497
Y417H + 200 μM BH_2	37,42	1,79	0,0085	45,73	0,34	0,7165
Y417H + 43 μM SP	38,26	2,63	0,0071	45,79	0,40	0,6781
Y417H + 75 μM SP	38,89	3,26	0,0028	46,02	0,63	0,5250
Y417H + 200 μM SP	39,21	3,58	0,0028	46,10	0,71	0,4854
Y417H + 200 μM 6-MPH₄	37,60	1,97	0,0103	45,12	-0,27	0,7869
Y417H + 500 μM 6-MPH₄	37,98	2,35	0,0027	45,47	0,08	0,9339
Y417H + 1000 μM 6-MPH₄	36,80	1,17	0,0306	43,29	-2,10	0,0666

Tabelle 19: Übergangstemperaturen $T_{m1/2}$ sowie $T_{m2/3}$ für Y417H unter Zugabe von BH_4 , BH_2 , Sepiapterin und 6-MPH₄. $\Delta T_{m1/2}$ und $\Delta T_{m2/3}$ zeigen den Temperaturunterschied im Vergleich zu Y417H ohne Zugabe eines Kofaktors.

3.5.2 Vergleich der Aktivierungsenergien der PAH-Varianten im Komplex mit BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄

Für die Kofaktoren BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ wurden ebenfalls kinetische Denaturierungen durchgeführt. Anschließend wurde der Logarithmus der Geschwindigkeitskonstanten im Arrheniusplot gegen die reziproke Temperatur aufgetragen und aus der Steigung der Geraden die Aktivierungsenergien berechnet. Die Aktivierungsenergien der Varianten im Komplex mit Sepiapterin und 6-MPH₄ konnten nicht berechnet werden, da die Standardabweichung in den zeitabhängigen Denaturierungen zu groß war. Daher werden im Folgenden nur die Daten mit BH₄ und BH₂ verglichen.

Der PAH-Wildtyp zeigte einen Anstieg der Aktivierungsenergien mit BH₄ und BH₂ um Faktor 1,5 und 1,2. Im Vergleich zum PAH-Wildtyp waren die Aktivierungsenergien von R68S und Y417H um 80% bzw. 46% erniedrigt. R261Q zeigte dafür eine um 17% höhere Aktivierungsenergie, was nochmals die möglicherweise etwas stabilere, da kompaktere Konformation der Variante auch ohne Kofaktor unterstreicht. Die Bindung von BH₄ an R68S führte zum Anstieg der Aktivierungsenergie um Faktor 2 und die BH₂-Bindung führte sogar zur 3,5-fachen Erhöhung der Aktivierungsenergie von R68S. Dafür zeigten weder BH₄ noch BH₂ einen signifikanten Einfluss auf die Variante R261Q, die wie oben beschrieben im nativen Zustand in einer stabileren Konformation vorzuliegen scheint. Die Aktivierungsenergie von Y417H konnte im Komplex mit BH₄ auf das Level des PAH-Wildtyps ohne Kofaktor angehoben werden und auch BH₂ zeigte eine Erhöhung der Aktivierungsenergie von Y417H um Faktor 1,6.

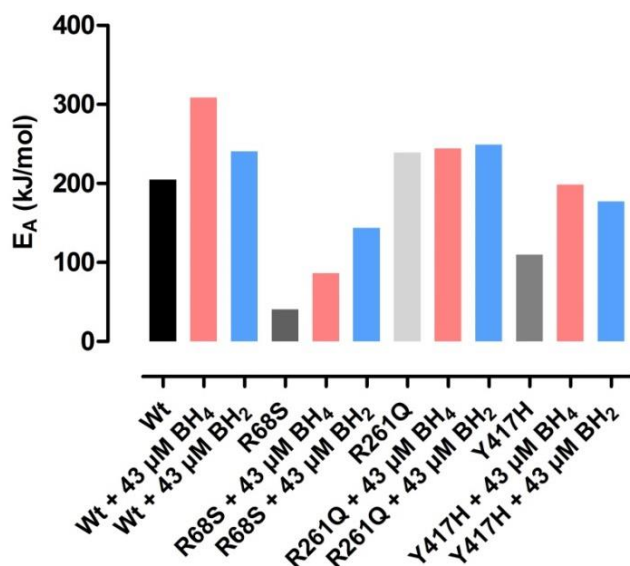


Abbildung 31: Aktivierungsenergien der PAH-Varianten R68S, R261Q und Y417H ohne und nach Zugabe der Kofaktoren BH₄ und BH₂ im Vergleich mit dem PAH-Wildtyp.

3.6 Analyse des Effekts des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin sowie des Substrats Phenylalanin auf die Denaturierung und Aggregation des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A

Um die Auswirkung von BH_4 auf die Stabilität muriner PAH zu untersuchen, wurde dessen Effekt auf die Entfaltung und Aggregation der murinen PAH analysiert. Zudem wurde in einem weiteren Schritt der Effekt des Substrats Phenylalanin sowie der gemeinsame Effekt von Substrat und Kofaktor auf den murinen PAH-Wildtyp und seine Variante V106A analysiert. Dafür wurden die Methoden der ANS-Fluoreszenzspektroskopie und des *right angle light scattering* angewandt.

3.6.1 Analyse des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A im DSF-Assay

In allen folgenden Untersuchungen wurde die murine PAH mit ihrem Fusionspartner MBP analysiert, da die Variante V106A ohne MBP zu instabil ist und eine Reinigung mit anschließender vergleichender Charakterisierung unmöglich wäre. In diesen Untersuchungen wurde BH_4 in einer finalen Konzentration von $43 \mu\text{M}$ und das Substrat Phenylalanin in einer finalen Konzentration von 1 mM eingesetzt.

3.6.1.1 Hydrophobizität des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A im nativen Zustand

Zunächst wurde der native Zustand der murinen PAH-Proteine ohne und mit BH_4 untersucht und miteinander verglichen.

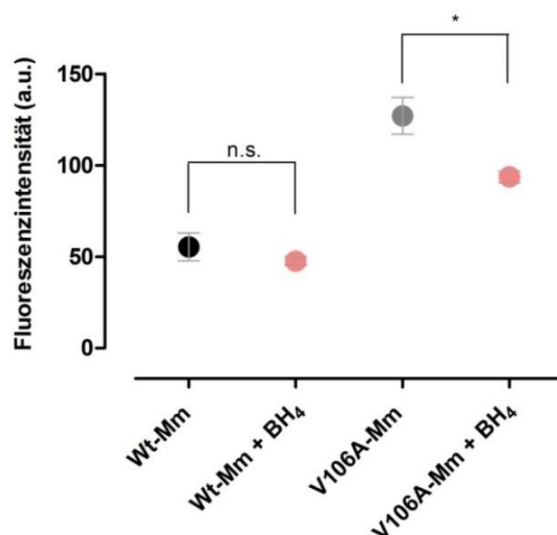


Abbildung 32: Vergleich der Hydrophobizität im Nativzustand des murinen PAH-Wildtyps und der murinen PAH-Variante V106A vor und nach Zugabe von BH_4 . Die Fluoreszenzwerte stammen jeweils aus vier unterschiedlichen Messungen und sind mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt.

Beim murinen PAH-Wildtyp kommt es durch Zugabe von BH_4 zu keiner signifikanten Änderung der Fluoreszenzintensität und damit der Hydrophobizität im nativen Zustand. Die Variante V106A zeigte im Vergleich zum Wildtyp eine signifikant erhöhte Fluoreszenzintensität, die durch Zugabe von BH_4 signifikant abnahm. Das bedeutet, dass die Variante V106A bereits partiell entfaltet vorliegt. Durch Zugabe von BH_4 wird die Anzahl der hydrophoben Seitenketten, an die ANS binden kann, offensichtlich verringert. Die Enzymvariante wird in einen kompakteren Zustand überführt und somit stabilisiert.

3.6.1.2 Analyse der thermischen Entfaltungskurven des murinen PAH-Wildtyp-Proteins und seiner Variante V106A durch Zugabe von BH_4 und Phenylalanin

Die Denaturierung des murinen PAH-Wildtyp-Proteins wurde ohne Zugabe von Kofaktor oder Substrat sowie nach Zugabe von BH_4 oder Phenylalanin als auch mit BH_4 und Phenylalanin gemeinsam untersucht.

Der murine PAH-Wildtyp zeigt, wie schon vom humanen PAH-Wildtyp bekannt, zwei Temperaturübergänge, die der Entfaltung der regulatorischen bzw. der katalytischen Domänen entsprechen.

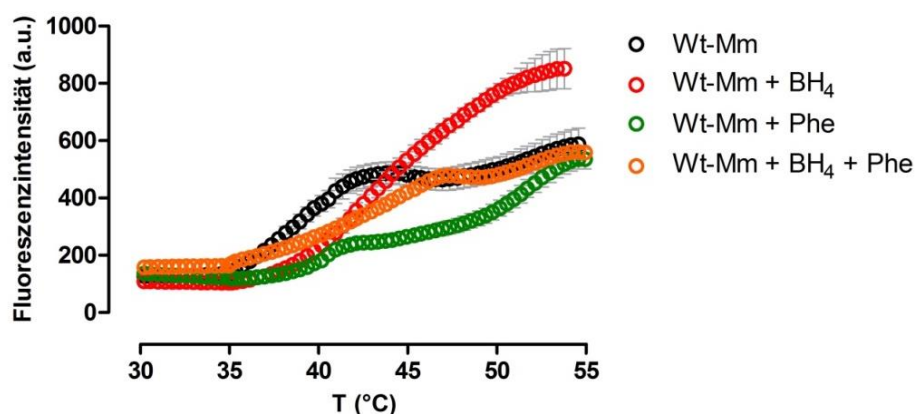


Abbildung 33: Entfaltung des murinen PAH-Wildtyps ohne Zugabe des Kofaktors oder des Substrats sowie nach Zugabe des Kofaktors BH_4 , des Substrats Phenylalanin sowie BH_4 und Phenylalanin in Kombination. Die Datenpunkte wurden aus drei Messungen generiert und mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt.

Nach Zugabe des Kofaktors BH_4 änderte sich der Kurvenverlauf, so dass nur noch ein Temperaturübergang zu berechnen war. Nach Zugabe von 1 mM des Substrats Phenylalanin kam es zu einer geringen Stabilisierung des ersten Temperaturübergangs um $1,1^\circ\text{C}$, während der zweite Temperaturübergang um $0,6^\circ\text{C}$ reduziert wurde. Durch die gemeinsame Zugabe von Phenylalanin und BH_4 zum murinen PAH-Wildtyp war der Kurvenverlauf, im Unterschied zu dem nach alleiniger Kofaktorgabe, zweiphasig. Der erste Temperaturübergang zeigte eine Rechtsverschiebung und eine damit einhergehende Stabilisierung um $3,0^\circ\text{C}$, der zweite Temperaturübergang um $0,7^\circ\text{C}$.

Auch für die PAH-Variante V106A wurde ein DSF-Assay durchgeführt, in dem der Einfluss von BH_4 und Phenylalanin sowohl einzeln als auch in Kombination untersucht wurde.

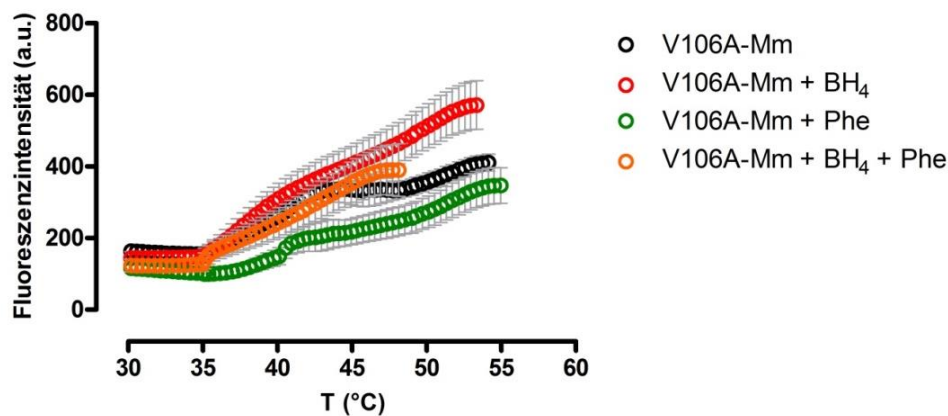


Abbildung 34: Entfaltung der murinen PAH-Variante V106A ohne Zugabe des Kofaktors oder des Substrats sowie nach Zugabe des Kofaktors BH_4 , des Substrats Phenylalanin sowie BH_4 und Phenylalanin in Kombination.

Alle vier gemessenen Entfaltungskurven zeigten einen zweiphasigen Verlauf. Insgesamt waren die Rechtsverschiebungen nach Zugabe des Kofaktors bzw. des Kofaktors und des Substrats geringer ausgeprägt als bei den Untersuchungen des murinen PAH-Wildtyps. Nach Zugabe von BH_4 kam es zu einer gering ausgeprägten Linksverschiebung der Entfaltungskurve, auch die Zugabe des Substrats Phenylalanin führte zu einer geringen Linksverschiebung des zweiten Temperaturübergangs. Durch Kombination von Substrat und Kofaktor kam es allerdings zu einer Rechtsverschiebung der Entfaltungskurve und damit zu einer Stabilisierung des Enzyms gegenüber thermischen Stress.

	$T_{m1/2}$	$\Delta T_{m1/2}$ (°C)	p-Wert	$T_{m2/3}$	$\Delta T_{m2/3}$ (°C)	p-Wert
Wt-Mm PAH	38,74	-	-	51,05	-	-
Wt-Mm + BH_4	44,30	5,56	0,0035	-	-	-
Wt-Mm + Phe	39,86	1,12	0,0236	50,42	-0,63	0,0047
Wt-Mm + BH_4 + Phe	41,70	2,96	0,0023	51,70	0,65	0,0206
V106A-Mm	39,17	-	-	50,85	-	-
V106A-Mm + BH_4	38,80	-0,37	0,3235	47,31	-3,54	0,0085
V106A-Mm + Phe	39,71	0,54	0,0682	49,65	-1,20	0,0019
V106A-Mm + BH_4 + Phe	40,68	1,51	0,0207	51,45	0,57	0,0912

Tabelle 20: T_m -Werte unter Einfluss des Kofaktors BH_4 und des Substrats Phenylalanin.

3.6.2 Analyse des Aggregationsverhaltens des murinen PAH-Wildtyp-Proteins und seiner Variante V106A durch *Right Angle Light Scattering*

Mit der Untersuchungsmethode des *Right Angle Light Scattering* wurde die Aggregation des murinen PAH-Wildtyps während der Erwärmung beobachtet. Die Aggregation des murinen PAH-Wildtyps und seiner Variante V106A wurde ohne Zugabe von Kofaktor oder Substrat sowie nach Zugabe von BH_4 und Phenylalanin als auch mit BH_4 und Phenylalanin gemeinsam untersucht.

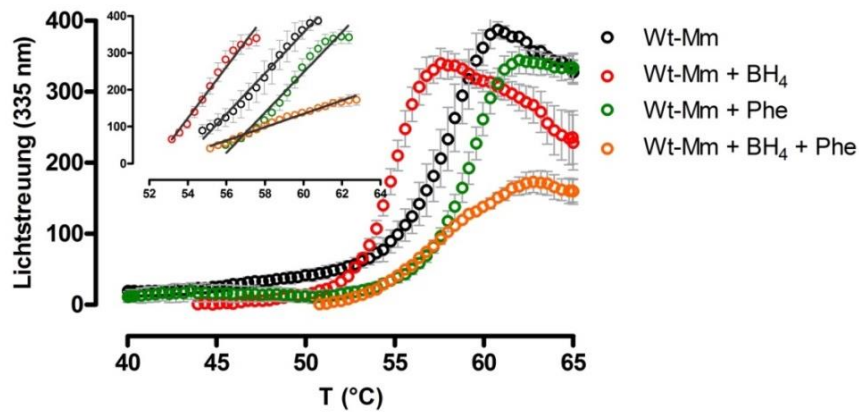


Abbildung 35: Aggregation des murinen PAH-Wildtyps im RALS-Assay ohne Zugabe des Kofaktors oder des Substrats sowie nach Zugabe des Kofaktors BH_4 , des Substrats Phenylalanin sowie BH_4 und Phenylalanin in Kombination. Die Datenpunkte wurden aus drei Messungen generiert und mit der Standardabweichung des Mittelwerts dargestellt.

Auch für die PAH-Variante V106A wurde ein RALS-Assay durchgeführt, in dem der Einfluss von BH_4 und Phenylalanin untersucht wurde.

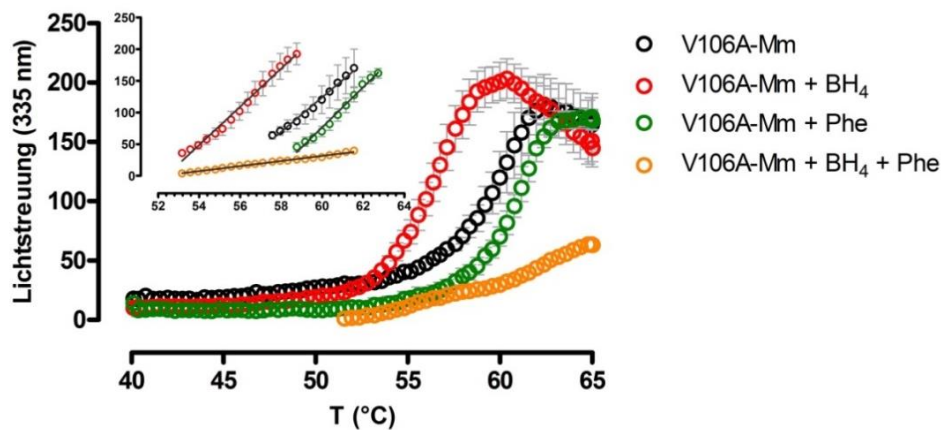


Abbildung 36: Aggregation der murinen PAH-Variante V106A im RALS-Assay ohne Zugabe des Kofaktors oder des Substrats sowie nach Zugabe des Kofaktors BH_4 , des Substrats Phenylalanin sowie BH_4 und Phenylalanin in Kombination.

Ohne Zugabe von Kofaktor oder Substrat erfolgte die Proteinaggregation für den Wildtyp und die Variante zwischen 50 und 60°C, um dann ein Maximum zu erreichen und wieder abzufallen. Der T_m -Wert lag beim murinen PAH-Wildtyp bei 57,2°C, bei der Variante V106A

bei 59,0°C. Unter Einfluss von 43 μM BH_4 kam es überraschenderweise in beiden Fällen zu einer deutlich früher einsetzenden Proteinaggregation bei niedrigeren Temperaturen (T_m PAH-Wildtyp 54,5°C, T_m V106A 55,9°C), während nach Zugabe von 1 mM Phenylalanin die Proteinaggregation erst bei geringfügig höheren Temperaturen einsetzte. Auch nach Zugabe von BH_4 und Phenylalanin in Kombination kam es zu keiner deutlichen Rechtsverschiebung der Aggregationskurven für den Wildtyp und die Variante, allerdings kam es zu einer auffallend verminderten Lichtstreuung sowohl für den Wildtyp als auch für die Variante.

	Wt-Mm		V106A-Mm	
	T_m (°C)	Steigung	T_m (°C)	Steigung
+ 0	57,20	55,31	58,95	27,24
+ BH_4	54,54	69,44	55,85	30,19
+ Phe	58,76	54,54	60,29	31,64
+ BH_4 + Phe	57,14	18,09	59,09	4,00

Tabelle 21: Vergleich der T_m -Werte sowie der Steigung der Aggregationskurven aus dem RALS-Assay.

Die starke Wirkung von Phenylalanin und BH_4 in Kombination zeigte sich noch deutlicher nach Analyse der Steigung der Aggregationsgeraden (Abbildung 36 und 37, kleines Fenster). Die Steigung der Geraden des PAH-Wildtyps reduzierte sich auf 32,7 % der Ausgangsgerade des Wildtyps ohne Kofaktor oder Substrat, die der Variante V106A sogar auf 14,7% der Ausgangsgeraden. Das bedeutet, dass die Aggregation von Wildtyp und Variante bei gleichzeitiger Anwesenheit des Substrats Phenylalanin und des Kofaktors BH_4 verlangsamt abläuft. Erst die Kombination von Kofaktor und Substrat zeigte die erwartete stabilisierende Wirkung auf den murinen PAH-Wildtyp und die Variante V106A.

Diese Erkenntnis ist von großer klinischer Relevanz, denn im Fall einer vorliegenden PKU sind die Phenylalaninwerte trotz strenger Diät in der Regel höher als in der gesunden Normalbevölkerung. So kann es, wie in diesem Experiment gezeigt, bei mit BH_4 behandelten Patienten durch die Kombination von Substrat und Kofaktor zur gewünschten stabilisierenden Wirkung auf die PAH kommen.

4. Diskussion

Die im Jahr 1934 erstmals beschriebene Phenylketonurie galt zunächst als Modellerkrankung für eine durch biochemische Prozesse ausgelöste Störung des Zentralnervensystems (Følling 1934). Mit der Entwicklung der phenylalaninarmen Diät durch den deutschen Kinderarzt Horst Bickel (Bickel *et al.* 1953) und durch die Einführung eines Massenscreenings auf PKU in den 1960er Jahren (Guthrie & Susi 1963) wurde die PKU zur Modellerkrankung für eine behandelbare angeborene Stoffwechselstörung (Muntau & Gersting 2010).

Ein weiterer Paradigmenwechsel erfolgte in den Jahren 2007 (USA) und 2008 (Europa) mit der Zulassung einer *orphan drug* zur pharmakologischen Behandlung einer Untergruppe von Patienten mit PKU durch Defekt der PAH. Zum Zeitpunkt der Zulassung war der zugrunde liegende Wirkmechanismus jedoch nicht bekannt.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit haben wir die molekularen Mechanismen untersucht, die der funktionellen Rekonstitution der Wildtyp-PAH und drei ihrer Varianten durch den Kofaktor BH₄ zugrunde liegen. Der Effekt von BH₄ wurde mit dem der Kofaktoren BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ verglichen. Abschließend wurde der gemeinsame Effekt des Kofaktors BH₄ und des Substrats Phenylalanin auf die murine PAH analysiert.

Spektrophotometrische Analyse der Proteindenaturierung

Bereits in früheren Arbeiten der Arbeitsgruppe um A.C. Muntau und S. Gersting konnte gezeigt werden, dass es bei Varianten der PAH zu einer frühzeitigen Entfaltung des Proteins kommt (Gersting *et al.* 2008). In der hier vorliegenden Arbeit wurde das Entfaltungsmuster der PAH und ausgewählter PAH-Varianten mittels ANS-Spektrophotometrie untersucht. Mit dieser Methode kann sowohl der primäre Faltungszustand bei Raumtemperatur als auch der Zeitraum der Entfaltung sowie der irreversiblen Denaturierung beurteilt werden.

Um die Versuche nun für die Fragestellungen dieser Doktorarbeit ausweiten zu können, musste der Entfaltungs-Assay dahingehend geprüft werden, ob die Temperaturschritte, mit der die Proteine erhitzt werden, einen Einfluss auf die Geschwindigkeit der Proteinentfaltung haben. Des Weiteren wurde geprüft, ob die Wahl unterschiedlicher Vektoren zur Herstellung des PAH-Proteins, sowie die Verwendung verschiedener Enzyme zur Abtrennung des MBP-Anhängsels von der PAH eine Auswirkung auf die Stabilität des Enzyms hat.

Bei der Untersuchung des Einflusses der Scan-Rate auf den Zeitpunkt der Proteindenaturierung konnte ein klarer Zusammenhang dieser Faktoren gezeigt werden. Je langsamer die Proteinerhitzung durchgeführt wird, also je länger jeder Temperaturschritt gehalten wird, desto niedriger ist die Temperatur, bei der die Proteinentfaltung beginnt. Dies zeigt, dass bei der Proteindenaturierung nicht nur die absolute Temperatur, sondern auch die Zeitdauer der Exposition gegenüber der Temperatur eine Rolle spielt. Deshalb wurden für sämtliche vergleichende Untersuchungen dieselben Temperaturschritte gewählt.

Je kürzer die Verweildauer bei den einzelnen Temperaturstufen gewählt wurde, desto geringer wurden die Unterschiede von $T_{m1/2}$ und $T_{m2/3}$. Deshalb wurde für die Messungen, die im Rahmen dieser Doktorarbeit durchgeführt wurden, eine Erhitzungsgeschwindigkeit von 1,2°C pro Minute verwendet.

Bei Abtrennung des MBP-tags durch Faktor Xa können 13 N-terminale Aminosäuren vom Protein getrennt werden, da neben der gewünschten Schnittstelle noch eine weitere Schnittstelle innerhalb der PAH existiert. Die vergleichende thermische Denaturierung von im Gateway-Vektor aufgereinigten humanen PAH-Wildtypen, die zum einen mit Enterokinase, zum anderen mit Faktor Xa vom MBP-tag geschnitten wurden, zeigte keinen signifikanten Unterschied im Denaturierungsmuster dieser beiden PAH-Wildtyp-Proteine. Deshalb wurden für die weiteren Untersuchungen PAH-Proteine verwendet, die mit Faktor Xa geschnitten wurden.

Zudem wurde in der Arbeitsgruppe ein neues Klonierungssystem, das Gateway® Cloning System der Firma Invitrogen, etabliert. Vergleichende fluoreszenzspektrophotometrische Untersuchungen von humanem PAH-Wildtyp, der über eine konventionelle Klonierungsmethode hergestellt wurde, sowie des humanen PAH-Wildtyps, der über die Gateway®-Klonierung hergestellt wurde, zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Proteindenaturierung. Im Rahmen dieser Doktorarbeit wurden auf dieser Grundlage sämtliche Untersuchungen mit humanen PAH-Proteinen durchgeführt, die über die Gateway®-Klonierungsmethode hergestellt worden sind.

Wirkung von BH₄ auf das PAH-Wildtyp-Protein und drei ausgewählte PAH-Varianten

Der Mechanismus durch den BH₄ zu einer höheren Enzymaktivität der PAH führt, war nicht geklärt. Deshalb wurde in dieser Arbeit der Effekt von BH₄ auf das PAH-Wildtyp-Protein sowie auf drei PAH-Varianten untersucht.

Durch Zugabe von BH₄ zeigte sich beim PAH-Wildtyp, und vor allem bei den untersuchten PAH-Varianten eine deutliche Rechtsverschiebung der Entfaltungskurve und somit eine Stabilisierung des Enzyms gegenüber thermischem Stress.

Ohne Gabe von BH₄ zeigten die Varianten deutlich früher, also bei niedrigeren Temperaturen, einsetzende Zeichen einer Denaturierung im Vergleich zum Wildtyp. So lagen die $T_{m1/2}$ - und $T_{m2/3}$ -Werte der Varianten R68S, R261Q und Y417H bei rund 10°C niedrigeren Temperaturen als die des PAH-Wildtyp-Proteins. Durch Zugabe von BH₄ kam es sowohl beim PAH-Wildtyp, als auch bei den Varianten zu einer späteren Proteindenaturierung, also bei höheren Temperaturen. Dieser Effekt war vor allem bei den Varianten, die durch Mutationen in der katalytischen Domäne und in der Oligomerisierungsdomäne verursacht werden, sehr deutlich. Es zeigte sich eine Rechtsverschiebung der Temperaturübergänge und damit eine Proteinstabilisierung um bis zu 8°C bzw. 6°C. Dadurch wurden nahezu die Übergangstemperaturen des PAH-Wildtyp-Proteins ohne BH₄-Zugabe erreicht.

Auch die Variante R68S, deren Mutation in der regulatorischen Domäne liegt, ist als BH₄-sensitive Mutation bekannt (Matalon *et al.* 2004; Perez *et al.* 2005; Staudigl *et al.* 2011; Anjema *et al.* 2013). Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit erhobenen Daten zeigten ebenfalls eine Rechtsverschiebung der Denaturierungskurve, wenn auch weniger stark ausgeprägt als bei den weiteren untersuchten Varianten. Allerdings fiel bei der Analyse der thermischen Denaturierung von R68S eine vergleichsweise stark erhöhte Fluoreszenzintensität im Nativzustand bei 25°C auf, wie auch schon von Gersting *et al.* für weitere Varianten der regulatorischen Domäne beschrieben (Gersting *et al.* 2008). Im PAH-Tetramer liegt Arginin 68 in engem Kontakt Tyrosin 237 der katalytischen Domäne. Durch Ersatz von Arginin durch Serin an Position 68 scheint die Verbindung zu Tyrosin nicht aufgebaut werden zu können, so dass es zu einer Störung der Tetramerstruktur des Enzyms kommt. Deshalb liegt das Enzym bereits im Nativzustand in einem partiell entfalteten Zustand vor. Durch Zugabe von BH₄ kommt es zu einem Absinken der Fluoreszenzintensität im Nativzustand auf Wildtypniveau. Pharmakologische Dosen des Kofaktors BH₄ bewirken hier also eine kompaktere Faltung des Enzyms, die wiederum zu einer Funktionsrekonstitution führt.

Die Fluoreszenzintensität im Nativzustand der Variante Y417H ist mit der des PAH-Wildtyps zu vergleichen. R261Q weist sogar eine etwas geringere Fluoreszenzintensität im Nativzustand auf als der Wildtyp. Arginin 261 liegt an der Schnittstelle zwischen der katalytischen Domäne und der Oligomerisierungsdomäne. Es interagiert mit Glutamin 304 und Threonin 238 über Wasserstoffbrückenbindungen und trägt so zur Konformation der katalytischen Domäne des Enzyms bei. Für die kompakte Faltung des Tetramers scheint aber vor allem die Interaktion von Arginin 261 mit Tyrosin 417 in der Oligomerisierungsdomäne maßgeblich zu sein. Nach Ersatz von Arginin an Position 261 durch Glutamin kommt es zu einer Annäherung der Oligomerisierungsdomäne an die katalytische Domäne, sodass die Enzymvariante R261Q im Nativzustand eine kompaktere Enzymkonformation aufweist (Erlandsen *et al.* 2004).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente belegen, dass BH₄ einerseits eine Stabilisierung der PAH gegenüber thermischen Stress bewirkt, wie vor allem an der signifikanten Rechtsverschiebung der T_m-Werte der PAH-Varianten nach Zugabe von BH₄ zu erkennen ist. Darüber hinaus unterstützt BH₄ die kompakte Faltung des Enzyms, wie die signifikante Verringerung der Fluoreszenzintensität der Variante R68S im Nativzustand zeigt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Beobachtungen, dass BH₄ eine Wechselwirkung mit der N-terminalen regulatorischen Domäne eingeht und über Wasserstoffbrückenbindungen einen stabilen Kofaktor-BH₄-Komplex bildet (Andersen *et al.* 2003; Solstad *et al.* 2003; Gersting *et al.* 2010b). Damit konnten wir zeigen, dass BH₄ als pharmakologisches Chaperon wirkt. Es induziert eine kompaktere und stabilere Konformation der PAH und schützt das Enzym vor einer durch Stress ausgelösten Entfaltung

(Fink 1999; Pey *et al.* 2004b; Arakawa *et al.* 2006; Broadley & Hartl 2009; Muntau *et al.* 2014).

In einem nächsten Schritt wurden aus den Daten der kinetischen Denaturierung die spezifischen Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps und seiner Varianten R68S, R261Q und Y417H vor und nach Zugabe von BH_4 berechnet.

Die Aktivierungsenergie ist die Energie, die aufgebracht werden muss, um ein Enzym vom gefalteten, nativen Zustand in einen entfalteten, denaturierten Zustand zu überführen. Je stabiler gefaltet ein Enzym also vorliegt, desto mehr Aktivierungsenergie ist notwendig, um es in den entfalteten Zustand zu überführen. R261Q zeigt mit 259,3 kJ/mol eine ähnliche, sogar etwas höhere Aktivierungsenergie als der PAH-Wildtyp mit 204 kJ/mol. Es ist davon auszugehen, dass diese Enzymvariante im Nativzustand bereits in einer kompakten Proteinkonformation vorliegt, sodass hier BH_4 keine maßgebliche Veränderung bewirkt. Im Vergleich dazu ist die Aktivierungsenergie der Varianten Y417H mit 153,8 kJ/mol deutlich niedriger als die des Wildtyps. Es ist davon auszugehen, dass durch Ersatz der Aminosäure Tyrosin durch Histidin an Position 417 eine gestörte Wechselwirkung mit R261 aus der katalytischen Domäne vorliegt, was zu einer weniger stabilen Struktur des Enzyms und somit zu einer geringeren kinetischen Stabilität führt.

Die mit Abstand geringste Aktivierungsenergie muss mit lediglich 79,9 kJ/mol bei der Variante R68S aufgebracht werden. Dies passt zu den Beobachtungen im DSF-Assay. Nachdem das Enzym schon im Nativzustand teilweise entfaltet vorliegt, benötigt es eine geringe Aktivierungsenergie, um in den denaturierten Zustand überzugehen.

Nach Zugabe von BH_4 erhöht sich die Aktivierungsenergie des PAH-Wildtyp-Proteins um den Faktor 1,5 auf 308,5 kJ/mol. Eine Stabilisierung um den Faktor 1,5, wenn auch von niedrigeren Ausgangswerten ausgehend, erfährt auch R68S durch Zugabe von BH_4 . Auch dies bestätigt die zuvor bereits beschriebene Beobachtung, dass BH_4 eine kompaktere Faltung der Enzymvariante bewirkt. Bei Y417H ist die Stabilisierung mit einem Faktor von 1,3 geringer ausgeprägt. Bei R261Q kommt es hingegen nur zu einer Erhöhung der Aktivierungsenergie um den Faktor 1,1 auf 285,6 kJ/mol, womit es jedoch nahezu die Aktivierungsenergie des Wildtyps nach BH_4 -Zugabe erreicht.

Struktur-Funktions-Beziehung bei PAH-Kofaktorbindung

Um zu untersuchen, welcher Teil von BH_4 mit der PAH in Interaktion tritt und die beschriebene stabilisierende Wirkung ausübt, wurde im Rahmen dieser Doktorarbeit der Effekt von BH_4 mit dem Effekt seines oxidierten Analogons BH_2 , seiner Vorstufe Sepiapterin, sowie dem des synthetischen Kofaktoranalogs 6-MPH₄ verglichen.

Bei BH_2 liegt im Gegensatz zu BH_4 ein oxidiertes Ringsystem vor, während die Seitenkette mit der von BH_4 identisch ist. Auch bei Sepiapterin liegt ein höher oxidiertes Ringsystem vor, allerdings besteht hier auch eine höher oxidierte Seitenkette, in der die Hydroxylgruppe durch eine Carbonylgruppe ersetzt wurde. Im Gegensatz dazu liegt bei 6-MPH₄ ein zum BH_4

identisches PterinGrundgerüst vor, aber die Dihydroxypropylseitenkette ist durch eine kürzere Methylseitenkette ersetzt.

Zunächst wurden analog zu den Untersuchungen mit BH₄ DSF-Assays zur thermischen Denaturierung der PAH und ihrer Varianten R68S, R261Q und Y417H unter Einfluss von BH₂, Sepiapterin und 6-MPH₄ durchgeführt.

BH₄ führt zu einer kompakteren Enzymfaltung und einer Stabilisierung gegenüber thermischem Stress in unterschiedlichem Ausmaß sowohl beim PAH-Wildtyp, als auch bei den untersuchten PAH-Varianten. Das BH₄-Analogon BH₂ führte beim Wildtyp, wie auch bei sämtlichen Varianten ebenfalls zu einer Erhöhung der T_m-Werte und damit zu einer Stabilisierung der Proteine gegenüber Hitzestress. Auch Sepiapterin bewirkte eine konzentrationsabhängige Stabilisierung von Wildtyp und Varianten. Bei beiden BH₄-Derivaten war der Effekt allerdings deutlich geringer ausgeprägt als bei BH₄. Das synthetische Kofaktoranalogen zeigte eine gering ausgeprägte, statistisch nicht signifikante Stabilisierung von T_{m1/2} bei Y417H. Beim PAH-Wildtyp und den Varianten R68S und R261Q allerdings kam es entweder zu keiner Veränderung der T_m-Werte oder sogar zu einer Linksverschiebung der Entfaltungskurve, also zu einer Destabilisierung der Proteine. Zudem kam es durch 6-MPH₄ zu einer konzentrationsabhängigen Erhöhung der Fluoreszenzaktivität im Nativzustand. Eine signifikante Reduktion der Fluoreszenzintensität von R68S im Nativzustand konnte von den Derivaten nur Sepiapterin in der höchsten untersuchten Konzentration bewirken.

In einem weiteren Schritt wurde die Aktivierungsenergien des PAH-Wildtyps und der PAH-Varianten nach Zugabe von BH₂ berechnet. Während BH₂ beim PAH-Wildtyp zu keiner deutlichen Erhöhung der Aktivierungsenergie führt wie BH₄, bewirkt es bei R68S mit einer Steigerung um den Faktor 3,5 eine größere Steigerung als der natürliche Kofaktor BH₄. Bei der Varianten Y417H führte BH₂ zu einer Steigerung der Aktivierungsenergie um den Faktor 1,6, die allerdings geringer ausgeprägt ist als die Steigerung durch BH₄. Nach Zugabe von BH₂ zu R261Q kommt es zu keiner signifikanten Änderung der Aktivierungsenergie, wie es bei dieser Variante auch schon nach Zugabe von BH₄ beobachtet wurde.

Zusammenfassend kann aus diesen Beobachtungen geschlossen werden, dass 6-MPH₄ zu der mit Abstand geringsten Stabilisierung des PAH-Proteins führt. Die Seitenkette von BH₄, die bei 6-MPH₄ durch eine Methylgruppe ersetzt wurde, unterstützt die kompakte Faltung des Proteins und führt zu einer Stabilisierung gegenüber Hitzestress. Liegt diese Seitenkette im oxidierten Zustand vor, wie es bei Sepiapterin der Fall ist, kommt es vor allem bei den Varianten mit Mutation in der katalytischen und in der Oligomerisierungsdomäne zu einer etwas stärker ausgeprägten Stabilisierung im Vergleich zu der durch BH₂ hervorgerufenen. Diese erreicht allerdings nicht den Effekt von BH₄. Bei R68S, also der Variante mit Mutation in der regulatorischen Domäne, bewirkte Sepiapterin eine Erniedrigung der Fluoreszenzintensität im Nativzustand und somit eine kompaktere Faltung des Proteins.

Es zeigte sich also, dass abhängig davon, in welcher Proteindomäne die Mutation der PAH liegt, unterschiedliche Strukturelemente des Kofaktors von Bedeutung sind. Dieses Wissen über die verschiedenen Wirkungsweisen des pharmakologischen Chaperons auf Mutationen der einzelnen Enzymdomänen muss in weiteren Experimenten vertieft werden und stellt einen ersten Schritt auf dem Weg zur maßgeschneiderten Therapie für den Patienten dar.

Diese Kenntnisse sind von klinischer und therapeutischer Bedeutung, da Sapropterindichlorid auf Grund seiner geringen Stabilität und Bioverfügbarkeit kein idealer Wirkstoff zur Behandlung der PKU ist. Es ist davon auszugehen, dass in Zukunft neue Moleküle benötigt werden, um einerseits eine noch effizientere Therapie, andererseits eine Therapie, die auch bei schwerwiegenden Genotypen wirkt, zu entwickeln.

Pah^{enu1} als Mausmodell zur Analyse des BH₄-Effekts auf die PAH

Bereits 2004 konnte gezeigt werden, dass bei transgenen Mäusen mit vollständiger oder partieller PAH-Defizienz durch Zugabe von BH₄ sowohl die Menge, als auch die *in vivo* Aktivität des hepatischen PAH-Wildtyps gesteigert wird (Thöny *et al.* 2004). Obwohl schon länger bekannt ist, dass die murine PAH der humanen PAH sehr ähnlich ist – sie unterscheiden sich lediglich in 36 von 452 Aminosäureresten (Ledley *et al.* 1990) – war bisher nicht geklärt, ob aus Untersuchungen am Mausmodell Schlüsse auf das Verhalten der humanen PAH gezogen werden dürfen. Für die humane PAH wurde bereits gezeigt, dass die stabilisierende Wirkung des Kofaktors BH₄ nicht auf einer geringeren Bindungsfähigkeit der mutierten PAH zum Kofaktor basiert, sondern BH₄ zu einer kompakteren, stabileren Enzymkonformation führt, die einerseits mit einer höheren Enzymaktivität verbunden ist und andererseits das Enzym vor einer frühzeitigen Aggregation und dadurch bedingtem Proteinabbau schützt (Pey *et al.* 2004a; Gersting *et al.* 2008). Dies war für die murine PAH bis dato nicht gezeigt worden. Die Frage, ob die murine *Pah^{enu1}*-Variante ein geeignetes Modell für die Untersuchung des Effekts von BH₄ als pharmakologisches Chaperon ist, sollte hier beantwortet werden.

Es ist bekannt, dass das PAH-Tetramer sowohl durch Bindung seines Kofaktors BH₄ als auch durch Bindung des Substrats Phenylalanin seine Konformation ändert. Durch diese Wechselwirkungen wird die Aktivität des Enzyms reguliert. Während die Bindung des Kofaktors BH₄ zu einer kompakten, inaktiven Proteinkonformation führt, bewirkt die Bindung von Phenylalanin die Bildung des aktiven katalytischen Zustands. So liegt das Enzym, solange kein Substrat vorhanden ist, durch die Komplexbildung mit BH₄ in einem geschützten Zustand vor, erst durch eine höhere Substratkonzentration entfaltet es seine volle Wirkung (Andersen *et al.* 2003; Stokka & Flatmark 2003; Stokka *et al.* 2004). Aufgrund dieser Beobachtungen wurde in den Untersuchungen zu dieser Promotionsarbeit der gemeinsame Effekt von Kofaktor und Substrat auf die Stabilität des murinen PAH-Wildtyp-Proteins sowie ihrer Variante V106A untersucht und mit den Effekten von BH₄ bzw. Phenylalanin allein verglichen.

Die DSF-Experimente zeigten eine Reduktion der Fluoreszenzintensität von V106A im Nativzustand nach Zugabe von BH₄, wie es auch schon bei der humanen PAH-Variante R68S nach BH₄-Zugabe beobachtet wurde. Dies zeigt, dass BH₄ auch bei der murinen PAH-Variante V106 eine kompaktere Enzymfaltung bewirkt.

In den Entfaltungskurven wurde eine deutliche Stabilisierung vor allem des murinen PAH-Wildtyps nach Zugabe des Substrats in Kombination mit dem Kofaktor beobachtet. Die gleichzeitige Bindung von BH₄ und Phenylalanin hat also einen starken Effekt auf die Stabilität der murinen PAH, wie es auch schon bei der humanen PAH beobachtet wurde (Andersen *et al.* 2002; Andersen *et al.* 2003).

Besonderes Augenmerk wurde bei der Untersuchung der murinen PAH auf ihr Aggregationsverhalten unter Einfluss des Kofaktors und des Substrats gerichtet. In der Analyse der Aggregationsgeraden zeigte sich eine Verlangsamung der Aggregation und damit Stabilisierung der Proteinstruktur erst nach Kombination von Substrat und Kofaktor. Übertragen auf PKU-Patienten würde das bedeuten, dass die variante PAH bei höheren Phenylalaninkonzentrationen in einem stabileren Faltungszustand vorliegt, der durch Gabe des pharmakologischen Chaperons BH₄ noch weiter stabilisiert wird. Diese Beobachtungen ließen sich auch auf die humane PAH übertragen. Unsere Arbeitsgruppe konnte 2010 zeigen, dass eine Präaktivierung der PAH mit Phenylalanin zu einer verbesserten Interaktion der PAH mit BH₄ führt (Gersting *et al.* 2010b). In einem weiteren Schritt wurde gezeigt, dass einige PAH-Varianten, z.B. auch die im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchte Variante R261Q, erst bei höherer Phenylalaninkonzentration ihre maximale Aktivität entfaltet. Eine wesentliche Erkenntnis war zudem, dass BH₄ seine volle Wirkung als pharmakologisches Chaperon erst dann zeigt, wenn Phenylalanin in erhöhter Konzentration vorliegt. So kommt es bei einer erniedrigten Phenylalaninkonzentration nicht zu einer Depletion der essentiellen Aminosäure Phenylalanin (Staudigl *et al.* 2011).

Der Datensatz zur Analyse des Aggregationsverhaltens der murinen PAH, der im Rahmen dieser Doktorarbeit entwickelt wurde, wurde in *Human Molecular Genetics* veröffentlicht (Gersting *et al.* 2010a). Zusammenfassend haben die Experimente an der murinen PAH zu der Erkenntnis geführt, dass die *Pah^{enu1}*-Maus ein geeignetes Modell zur Untersuchung der molekularen Mechanismen bei BH₄-sensitiver PKU darstellt. Damit ist dieses Mausmodell auch in ausgezeichneter Weise geeignet, die Wirkung zukünftig entdeckter Moleküle zu untersuchen.

Ausblick

Die Entdeckung des zugrundeliegenden Pathomechanismus der PKU und die Einführung der phenylalaninarmen Diät haben die PKU zur behandelbaren Erkrankung gemacht. Doch trotz dieser bahnbrechenden Fortschritte besteht weiterhin Handlungsbedarf zur Optimierung der Patientenversorgung.

Die Durchführung der streng phenylalaninarmen Diät, die durch Aminosäuresupplemente ergänzt werden muss, führt bei einer Vielzahl der Patienten und deren Familien zu einer hochgradigen sozialen und psychischen Belastung. Zusätzlich muss auf eine ausreichende Versorgung mit Vitaminen, Mineralstoffen und Spurenelementen geachtet werden, damit Mangelerscheinungen vermieden werden können. Deshalb wird nicht nur in Bezug auf Geschmack und Darreichungsform der phenylalaninfreien Aminosäuresupplementation dauerhaft an einer Verbesserung gearbeitet, sondern auch der Gehalt an Vitaminen und Spurenelementen wird regelmäßig den aktuellen Empfehlungen angepasst (Geiger *et al.* 2016).

Aktuell werden auch wieder Nahrungsergänzungen durch LNAA (*large neutral amino acids*) und GMP (*glycomacropeptide*) vermehrt diskutiert.

Eine Supplementation mit LNAA wurde bereits 1976 erstmals vorgeschlagen (Andersen & Avins 1976). Die Aminosäure Phenylalanin konkurriert mit anderen LNAAs, also anderen großen neutralen Aminosäuren wie Arginin, Histidin, Isoleucin, Leucin, Lysin, Methionin, Threonin, Tryptophan, Tyrosin und Valin um spezifische Transportproteine, die für die Membranpassage der Aminosäuren sowohl bei der Aufnahme aus den Verdauungsorganen in das Blut, als auch bei der Überquerung der Blut-Hirn-Schranke verantwortlich sind. Aufgrund der hohen Affinität dieser Transportproteine zu Phenylalanin wird bei hohen Phenylalaninkonzentrationen im Blut viel Phenylalanin über die Blut-Hirn-Schranke transportiert (Broer 2008). Durch die Supplementation von anderen LNAA kommt es zu einer kompetitiven Inhibition der Phenylalaninaufnahme sowohl im Darm als auch bei der Passage der Blut-Hirn-Schranke (Pietz *et al.* 1999; Weglage *et al.* 2001; Schindeler *et al.* 2007; Matalon *et al.* 2007). Außerdem scheint die Gabe von LNAA zu einer höheren Verfügbarkeit von essentiellen Aminosäuren im zentralen Nervensystem zu führen (van Spronsen *et al.* 2010). Die Verwendung von LNAA gilt besonders bei erwachsenen Patienten mit erhöhten Phenylalaninkonzentrationen aufgrund von einer erniedrigten Diätcompliance oder einer bereits beendigten Diät sinnvoll (Macleod & Ney 2010). Bisher gibt es allerdings keine Daten zur Sicherheit und Effizienz der Verwendung von LNAA bei Kindern und Schwangeren (Camp *et al.* 2014), sodass weitere Studien dazu folgen müssen.

Glykomakropeptid ist ein natürliches Eiweiß, das bei der Käseherstellung entsteht und einen relativ niedrigen Phenylalaningehalt aufweist (2,5 – 5,0 mg Phenylalanin/ 1 g Protein). Da es ein natürliches Protein ist, kommt es zu einer langsameren Proteinaufnahme und besseren Verwertung im Vergleich mit herkömmlichen Aminosäuremischungen. Zudem ist es geschmacksneutral, was es zu einer besseren Diätcompliance der Patienten führt (van Calcar & Ney 2012; Ney *et al.* 2014). Allerdings ist auch der Histidin-, Leucin-, Tryptophan- und Tyrosingehalt recht niedrig, sodass es bisher nur als Ergänzung zu herkömmlichen Aminosäuresupplementationen verwendet werden kann. Für die Einnahme von GMP von Kindern unter 11 Jahren wurden bisher keine Studien durchgeführt (Camp *et al.* 2014).

Nach Diagnosestellung einer PKU werden die Patienten in der Regel in ein pädiatrisches Stoffwechselzentrum verlegt. Hier erfolgen die Konfirmationsdiagnostik und der Beginn der Diättherapie. Seit Juli 2015 ist bei BH_4 -responsiven Patienten die Therapie mit Sapropterindichlorid ab dem Säuglingsalter zugelassen. Im Verlauf erfolgen regelmäßige Vorstellungen zur Therapiekontrolle im Stoffwechselzentrum, die Frequenz der Vorstellungen ist abhängig vom Bedarf der Patienten, erfolgt in der Regel aber etwa jedes zweite Quartal. Immer häufiger erfolgt die Betreuung von Stoffwechselpatienten in sogenannten „Sozialpädiatrischen Zentren“, kurz SPZ. Diese sind in der Regel an Universitätsklinika angebunden und ermöglichen eine interdisziplinäre Betreuung der Patienten durch ein Team bestehend aus Ärzten der Stoffwechselabteilung und Neurologie, Ernährungsberatern, Psychologen und Physiotherapeuten. Die Betreuung hier kann unkompliziert und individuell an die Bedürfnisse des Patienten und seine Familie angepasst werden.

Da das Neugeborenen Screening für die PKU bereits Ende der 60er Jahre eingeführt wurde, sind viele Patienten, die als Kind eine phenylalaninfreie Diät durchgeführt haben, mittlerweile erwachsen. Es wurde bereits beschrieben, dass entgegen heutiger Empfehlungen damals eine Diätbeendigung im Jugendalter durchgeführt wurde. Vielen erwachsenen Patienten ist nicht mehr bewusst, dass sie an einer Phenylketonurie leiden oder dass diese auch im Erwachsenenalter zu Symptomen wie psychiatrischen Auffälligkeiten, neurologischen Symptomen und Hautekzemen führen kann. Andere Patienten wiederum werden auch weiterhin in Kinderkliniken betreut, da in vielen Stoffwechselzentren für Erwachsene die Expertise in Bezug auf die Betreuung und Behandlung von PKU-Patienten, insbesondere schwangeren PKU-Patientinnen fehlt (Mutze *et al.* 2011b). Deshalb ist langfristig eine schrittweise Translation der Patienten in die Erwachsenenmedizin notwendig. Hierfür wird ein enger Austausch zwischen den bisher betreuenden Kinderärzten und Ernährungsberatung, sowie den Erwachsenenmedizinern empfohlen (Crowley *et al.* 2011; Mutze *et al.* 2011a; Camp *et al.* 2014).

Auch der Austausch der Patienten untereinander über neue Therapieoptionen, Diätführung, Folgeschäden etc. über neue Medien wie Internetforen oder Facebook-Gruppen darf nicht unterschätzt werden. Natürlich stellt dies einerseits eine Gefahr der Fehlinformation oder Panikmache dar, andererseits bedeutet es aber für einen Großteil der Patienten und deren Familien eine Erleichterung zu wissen, dass sie „nicht allein“ sind. Zudem bedeuten die Informationen, die im Internet zu finden sind, auch für erwachsene PKU-Patienten, die nicht mehr in ärztlicher Betreuung sind, eine unkompliziert zu erreichende Informationsquelle, mit deren Hilfe sie sich eventuell auch wieder dazu entschließen, sich in ärztliche Behandlung zu begeben.

Nicht zuletzt ist die leitliniengerechte Betreuung der Patienten von enormer Bedeutung. Aktuell werden sowohl im deutschsprachigen als auch im gesamten europäischen Raum neue Leitlinien zur Therapie der PKU ausgearbeitet (<http://www.asim-med.de/leitlinienprojekt-pku>, <http://www.espku.org/2016/01/25/european-phenylketonuria-pku-guidelines/>). In diese sollen die neuen Erkenntnisse zu Langzeitfolgen erhöhter

Phenylalaninkonzentration und gegebenenfalls eine Anpassung des therapeutischen Zielbereichs der Phenylalaninkonzentration von PKU-Patienten genauso eingearbeitet werden wie Behandlungsempfehlungen zur Therapie mit Sapropterindichlorid.

Neue Therapieoptionen

Die Therapie mit Sapropterindichlorid führt nur bei etwa 40% der PKU-Patienten zu einer maßgeblichen, das heißt mindestens 30%-igen Reduktion der Phenylalaninkonzentrationen. Vor allem für die Patienten, für die die Therapie mit BH₄ keine Option darstellt, wird weiter nach anderen Therapieoptionen gesucht.

Die aktuell wohl am meisten Erfolg versprechende Methode ist die Anwendung von PEG-PAL. Diese Abkürzung steht für Polyethylenglykol-konjugierte Phenylalanin-Ammoniak-Lyase; diese soll als Enzymersubstitutionstherapie eingesetzt werden. Die Phenylalanin-Ammoniak-Lyase ist ein Enzym, das in einigen Pflanzen, Hefen, Bakterien und Pilzen, nicht aber in Säugetieren exprimiert wird und Phenylalanin unter Bildung von Ammoniak zu Trans-Zimtsäure abbaut. Für den Einsatz als Enzymersatz wurde eine rekombinant aufgereinigte PAL entwickelt, die genetisch so modifiziert wurde, dass sie eine höhere Proteaseresistenz aufweist. Außerdem wird sie an PEG gebunden verabreicht, da so die Immunantwort des Patienten reduziert werden kann. Während die orale Verabreichung von PEG-PAL bisher nur zu einer mäßigen Reduktion der Phenylalaninkonzentration in Mäusen geführt hat (Sarkissian *et al.* 2011; Camp *et al.* 2014), laufen aktuell zwei verblindete, plazebokontrollierte Phase III-Studien zur Effizienz und Sicherheit einer wöchentlich durch den Patienten selbst subkutan zu injizierenden PEG-PAL-Therapie bei erwachsenen PKU-Patienten (Blau & Longo 2015).

Während eine Lebertransplantation die Heilung einer PKU bedeuten würde (Vajro *et al.* 1993) steht die Bürde, die PKU-Patienten tragen müssen, in einer zu geringen Relation zu den Risiken einer Transplantation und anschließenden, lebenslangen Immunsuppression. In Zeiten des Organmangels wäre die PKU als Indikation zur Transplantation auch nicht gegeben. Ein innovativer Therapieansatz ist die Transplantation von gesunden Leberzellen, das heißt von Hepatozyten mit funktionierender PAH. Das größte Problem hierbei ist, dass die transplantierten Leberzellen keinen Wachstumsvorteil gegenüber den bereits vorhandenen, PAH-defizienten Leberzellen haben. Der Ersatz von lediglich 10% der kranken Hepatozyten durch Hepatozyten mit einer korrekten PAH-Funktion führte im Mausmodell zu einer signifikanten Verbesserung der Stoffwechseleinstellung PKU-kranker Mäuse. In der Universität von Pittsburgh, USA, wird aktuell eine Phase II-Studie zur Transplantation von PAH-positiven Hepatozyten in erwachsenen Patienten durchgeführt (Hamman *et al.* 2005; Hamman *et al.* 2011; Camp *et al.* 2014).

In den vergangenen Jahren wurde auch die Möglichkeit der Korrektur varianter PAH durch die Einbringung einer korrekten PAH-Kopie über Gentherapie viel diskutiert. Im Mausmodell

konnte bereits von mehreren Arbeitsgruppen über intravenöse oder intramuskuläre Injektion muriner *PAH* innerhalb eines rekombinanten AAV8- (adenoassoziiertes Virus Serotyp 8-) Vektors eine ausreichende PAH-Aktivität in der Empfängerleber erreicht werden, um die Blutphenylalaninkonzentration in den Normbereich abzusenken (Harding *et al.* 2006; Ding *et al.* 2006; Ding *et al.* 2008; Rebuffat *et al.* 2010; Yagi *et al.* 2011). Allerdings kommt es bei der Gentherapie über AAV8-Vektor nicht zu einer Integration des Vektorgenoms in das Empfänger-genom, sodass es nach etwa einem Jahr zu einer Abnahme der PAH-Funktion kam (Rebuffat *et al.* 2010; Camp *et al.* 2014). Aktuell wird daran gearbeitet, eine Reinjektion des Vektors zu ermöglichen, was momentan noch aufgrund der Immunantwort nach primärer Injektion scheitert, genauso werden sichere Wege zur Integration des viralen Vektorgenoms in das Empfänger-genom gesucht. Auch Alternativen zur Gentherapie über virale Vektoren, wie zum Beispiel die Einbringung PAH-produzierender „minicircles“ (zirkuläre, superspiralisierte Expressionskassetten, die nur das gewünschte Gen erhalten (Mayrhofer *et al.* 2009) werden untersucht.

Obwohl es sich bei der PKU um die wohl am besten erforschte angeborene Stoffwechselerkrankung handelt, bestehen weiterhin viele offene Fragen bezüglich der optimalen Therapie und Versorgung der Patienten. Neben der Einführung von BH_4 als Therapie für etwa 40% der PKU-Patienten wird weiter an neuen Therapieoptionen geforscht, um auch für nicht BH_4 -sensitive Patienten eine Verbesserung der Therapiemöglichkeiten und damit der Lebensqualität zu erreichen.

5. Zusammenfassung

Die Phenylketonurie galt lange Zeit als eine ausschließlich diätetisch behandelbare angeborene Stoffwechselerkrankung. Durch die Etablierung der Verabreichung pharmakologischer Dosen des natürlichen Kofaktors BH₄ konnte bei etwa 40% der PKU-Patienten eine maßgeblich gesteigerte PAH-Aktivität erzielt werden. Diese BH₄-sensitiven Patienten profitieren seit Einführung von Kuvan® von einer signifikant weniger strengen Diät oder können diese sogar komplett beenden. Die genaue Wirkungsweise von BH₄ war jedoch nicht geklärt. Im Rahmen dieser Promotionsarbeit konnten drei wesentliche Ziele, die zum besseren Verständnis der Wirkungsweise von BH₄ beitragen, erreicht werden.

1. In den Untersuchungen der ANS-Fluoreszenzspektroskopie und des *right angle light scattering* konnte der stabilisierende Einfluss des Kofaktors BH₄ sowohl auf die thermische und kinetische Proteindenaturierung als auch auf das Aggregationsverhalten des PAH-Wildtyp-Proteins sowie drei seiner varianten Proteine belegt werden.
2. Im Vergleich des Kofaktors BH₄ mit dem oxidierten Kofaktoranalogen BH₂, der Vorstufe Sepiapterin und dem synthetischen Kofaktoranalogen 6-MPH₄ konnte gezeigt werden, dass 6-MPH₄, dessen Pteringrundgerüst mit dem von BH₄ identisch ist, bei dem aber die Dihydroxypropylseitenkette durch eine Methylgruppe ersetzt ist, insgesamt die geringste stabilisierende Wirkung auf die PAH und ihre Varianten ausübte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass die Seitenkette von BH₄ primär zu einer kompakteren Faltung des Proteins führt und damit auch zu einer Stabilisierung der PAH und ihrer Varianten gegenüber Hitzestress. Zudem konnte gezeigt werden, dass abhängig davon, in welcher Proteindomäne die Mutation der PAH vorliegt, Sepiapterin und BH₂ einen unterschiedlich starken Effekt auf die Stabilisierung der PAH und ihrer Varianten ausüben.
3. Der abschließende Projektteil der Promotionsarbeit beschäftigte sich mit dem mutagenisierten Mausmodell *Pah^{enu1}*. Auch hier konnte die stabilisierende Wirkung des Kofaktors BH₄ auf die murine PAH bestätigt werden. Eine wesentliche Erkenntnis dieser Untersuchungen lag zudem darin, dass ein gleichzeitiges Vorliegen von Substrat und Kofaktor zu einer maßgeblichen Stabilisierung der varianten PAH führt. Daraus kann geschlussfolgert werden, dass die murine PAH ein geeignetes Modell zur weiteren Analyse des BH₄-Effekts auf die PAH darstellt.

Dieses vertiefte Wissen über die Wirkungsweise des pharmakologischen Chaperons BH₄ stellt die Grundlage für das Design neuer synthetischer Chaperone dar, die eine verbesserte Wirkung im Vergleich zu BH₄ aufweisen und die Vision maßgeschneiderter, mutationsabhängiger Therapien für den einzelnen Patienten eröffnen.

Darüber hinaus konnten die für die PKU und BH₄ erarbeiteten Ergebnisse bereits auf weitere genetische Erkrankungen übertragen werden (Muntau *et al.* 2014). Damit ist die PKU nun auch eine Modellerkrankung für pharmakologisch therapierbare Erkrankungen mit Proteinfehlfaltung.

6. Literaturverzeichnis

- Abita, J. P., S. Milstien, N. Chang, and S. Kaufman, 1976 In vitro activation of rat liver phenylalanine hydroxylase by phosphorylation. *J.Biol.Chem.* **251**: 5310-5314.
- Al, H. N., and J. Christodoulou, 2015 Phenylketonuria: a review of current and future treatments. *Transl.Pediatr.* **4**: 304-317.
- American Academy of Pediatrics, 2001 American Academy of Pediatrics: Maternal phenylketonuria. *Pediatrics* **107**: 427-428.
- Andersen, A. E., and L. Avins, 1976 Lowering brain phenylalanine levels by giving other large neutral amino acids. A new experimental therapeutic approach to phenylketonuria. *Arch.Neurol.* **33**: 684-686.
- Andersen, O. A., T. Flatmark, and E. Hough, 2002 Crystal structure of the ternary complex of the catalytic domain of human phenylalanine hydroxylase with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine, and its implications for the mechanism of catalysis and substrate activation. *J.Mol.Biol.* **320**: 1095-1108.
- Andersen, O. A., A. J. Stokka, T. Flatmark, and E. Hough, 2003 2.0Å resolution crystal structures of the ternary complexes of human phenylalanine hydroxylase catalytic domain with tetrahydrobiopterin and 3-(2-thienyl)-L-alanine or L-norleucine: substrate specificity and molecular motions related to substrate binding. *J.Mol.Biol.* **333**: 747-757.
- Anderson, P. J., and V. Leuzzi, 2010 White matter pathology in phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **99 Suppl 1**: S3-S9.
- Anderson, P. J., S. J. Wood, D. E. Francis, L. Coleman, V. Anderson *et al.* 2007 Are neuropsychological impairments in children with early-treated phenylketonuria (PKU) related to white matter abnormalities or elevated phenylalanine levels? *Dev.Neuropsychol.* **32**: 645-668.
- Anjema, K., M. van Rijn, F. C. Hofstede, A. M. Bosch, C. E. Hollak *et al.* 2013 Tetrahydrobiopterin responsiveness in phenylketonuria: prediction with the 48-hour loading test and genotype. *Orphanet.J.Rare.Dis.* **8**: 103.
- Arakawa, T., D. Ejima, Y. Kita, and K. Tsumoto, 2006 Small molecule pharmacological chaperones: From thermodynamic stabilization to pharmaceutical drugs. *Biochim.Biophys.Acta* **1764**: 1677-1687.
- Azen, C. G., R. Koch, E. G. Friedman, S. Berlow, J. Coldwell *et al.* 1991 Intellectual development in 12-year-old children treated for phenylketonuria. *Am.J.Dis.Child* **145**: 35-39.
- Barat, P., N. Barthe, I. Redonnet-Vernhet, and F. Parrot, 2002 The impact of the control of serum phenylalanine levels on osteopenia in patients with phenylketonuria. *Eur.J.Pediatr.* **161**: 687-688.
- Belanger-Quintana, A., A. Burlina, C. O. Harding, and A. C. Muntau, 2011 Up to date knowledge on different treatment strategies for phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **104 Suppl**: S19-S25.

- Bick, U., G. Fahrendorf, A. C. Ludolph, P. Vassallo, J. Weglage *et al.* 1991 Disturbed myelination in patients with treated hyperphenylalaninaemia: evaluation with magnetic resonance imaging. *Eur.J.Pediatr.* **150**: 185-189.
- Bickel, H., J. Gerrard, and E. M. Hickmans, 1953 Influence of phenylalanine intake on phenylketonuria. *Lancet* **265**: 812-813.
- Bik-Multanowski, M., B. Didycz, R. Mozrzymas, M. Nowacka, L. Kaluzny *et al.* 2008 Quality of life in noncompliant adults with phenylketonuria after resumption of the diet. *J.Inherit.Metab Dis.* **31 Suppl 2**: S415-S418.
- Bilder, D. A., B. K. Burton, H. Coon, L. Leviton, J. Ashworth *et al.* 2013 Psychiatric symptoms in adults with phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **108**: 155-160.
- Blau, N., J. B. Hennermann, U. Langenbeck, and U. Lichter-Konecki, 2011 Diagnosis, classification, and genetics of phenylketonuria and tetrahydrobiopterin (BH4) deficiencies. *Mol.Genet.Metab* **104 Suppl**: S2-S9.
- Blau, N., and N. Longo, 2015 Alternative therapies to address the unmet medical needs of patients with phenylketonuria. *Expert.Opin.Pharmacother.* **16**: 791-800.
- Blau, N., F. J. van Spronsen, and H. L. Levy, 2010 Phenylketonuria. *Lancet* **376**: 1417-1427.
- Broadley, S. A., and F. U. Hartl, 2009 The role of molecular chaperones in human misfolding diseases. *FEBS Lett.* **583**: 2647-2653.
- Broer, S., 2008 Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia. *Physiol Rev.* **88**: 249-286.
- Brumm, V. L., C. Azen, R. A. Moats, A. M. Stern, C. Broomand *et al.* 2004 Neuropsychological outcome of subjects participating in the PKU adult collaborative study: a preliminary review. *J.Inherit.Metab Dis.* **27**: 549-566.
- Brumm, V. L., D. Bilder, and S. E. Waisbren, 2010 Psychiatric symptoms and disorders in phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **99 Suppl 1**: S59-S63.
- Burton, B. K., D. J. Adams, D. K. Grange, J. I. Malone, E. Jurecki *et al.* 2011 Tetrahydrobiopterin therapy for phenylketonuria in infants and young children. *J.Pediatr.* **158**: 410-415.
- Camp, K. M., M. A. Parisi, P. B. Acosta, G. T. Berry, D. A. Bilder *et al.* 2014 Phenylketonuria Scientific Review Conference: state of the science and future research needs. *Mol.Genet.Metab* **112**: 87-122.
- Carluccio, C., F. Fraternali, F. Salvatore, A. Fornili, and A. Zagari, 2016 Towards the identification of the allosteric Phe-binding site in phenylalanine hydroxylase. *J.Biomol.Struct.Dyn.* **34**: 497-507.
- Centerwall, S. A., and W. R. Centerwall, 2000 The discovery of phenylketonuria: the story of a young couple, two retarded children, and a scientist. *Pediatrics* **105**: 89-103.
- Chace, D. H., J. C. DiPerna, and E. W. Naylor, 1999 Laboratory integration and utilization of tandem mass spectrometry in neonatal screening: a model for clinical mass spectrometry in the next millennium. *Acta Paediatr.Suppl* **88**: 45-47.

- Christ, S. E., M. H. Price, K. E. Bodner, C. Saville, A. J. Moffitt *et al.* 2016 Morphometric analysis of gray matter integrity in individuals with early-treated phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab.*
- Cleary, M. A., J. H. Walter, J. E. Wraith, J. P. Jenkins, S. M. Alani *et al.* 1994 Magnetic resonance imaging of the brain in phenylketonuria. *Lancet* **344**: 87-90.
- Cleary, M. A., J. H. Walter, J. E. Wraith, F. White, K. Tyler *et al.* 1995 Magnetic resonance imaging in phenylketonuria: reversal of cerebral white matter change. *J.Pediatr.* **127**: 251-255.
- Corsellis, J. A., 1953 The pathological report of a case of phenylpyruvic oligophrenia. *J.Neurol.Neurosurg.Psychiatry* **16**: 139-143.
- Cortez, L., and V. Sim, 2014 The therapeutic potential of chemical chaperones in protein folding diseases. *Prion.* **8**.
- Costas, M., M. P. Mehn, M. P. Jensen, and L. Que, Jr., 2004 Dioxygen activation at mononuclear nonheme iron active sites: enzymes, models, and intermediates. *Chem.Rev.* **104**: 939-986.
- Crowley, R., I. Wolfe, K. Lock, and M. McKee, 2011 Improving the transition between paediatric and adult healthcare: a systematic review. *Arch.Dis.Child* **96**: 548-553.
- Cunningham, A., H. Bausell, M. Brown, M. Chapman, K. DeFouw *et al.* 2012 Recommendations for the use of sapropterin in phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **106**: 269-276.
- Cunningham, G. C., 1966 Phenylketonuria. Early detection, diagnosis and treatment. *Calif.Med.* **105**: 1-7.
- Danecka, M. K., M. Woidy, J. Zschocke, F. Feillet, A. C. Muntau *et al.* 2015 Mapping the functional landscape of frequent phenylalanine hydroxylase (PAH) genotypes promotes personalised medicine in phenylketonuria. *J.Med.Genet.* **52**: 175-185.
- de Sonnevile, L. M., S. C. Huijbregts, R. Licht, J. A. Sergeant, and F. J. van Spronsen, 2011 Pre-attentive processing in children with early and continuously-treated PKU. Effects of concurrent Phe level and lifetime dietary control. *J.Inherit.Metab Dis.* **34**: 953-962.
- Demirdas, S., H. Maurice-Stam, C. C. Boelen, F. C. Hofstede, M. C. Janssen *et al.* 2013 Evaluation of quality of life in PKU before and after introducing tetrahydrobiopterin (BH4); a prospective multi-center cohort study. *Mol.Genet.Metab.*
- Ding, Z., P. Georgiev, and B. Thöny, 2006 Administration-route and gender-independent long-term therapeutic correction of phenylketonuria (PKU) in a mouse model by recombinant adeno-associated virus 8 pseudotyped vector-mediated gene transfer. *Gene Ther.* **13**: 587-593.
- Ding, Z., C. O. Harding, A. Rebuffat, L. Elzaouk, J. A. Wolff *et al.* 2008 Correction of murine PKU following AAV-mediated intramuscular expression of a complete phenylalanine hydroxylating system. *Mol.Ther.* **16**: 673-681.
- Eijgelshoven, I., S. Demirdas, T. A. Smith, J. M. van Loon, S. Latour *et al.* 2013 The time consuming nature of phenylketonuria: a cross-sectional study investigating time burden and costs of phenylketonuria in the Netherlands. *Mol.Genet.Metab* **109**: 237-242.

- Enns, G. M., R. Koch, V. Brumm, E. Blakely, R. Suter *et al.* 2010 Suboptimal outcomes in patients with PKU treated early with diet alone: revisiting the evidence. *Mol.Genet.Metab* **101**: 99-109.
- Erlandsen, H., A. L. Pey, A. Gamez, B. Perez, L. R. Desviat *et al.* 2004 Correction of kinetic and stability defects by tetrahydrobiopterin in phenylketonuria patients with certain phenylalanine hydroxylase mutations. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **101**: 16903-16908.
- Erlandsen, H., and R. C. Stevens, 1999 The structural basis of phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **68**: 103-125.
- Evans, S., A. Daly, J. MacDonald, M. A. Preece, S. Santra *et al.* 2014 The micronutrient status of patients with phenylketonuria on dietary treatment: an ongoing challenge. *Ann.Nutr.Metab* **65**: 42-48.
- Feillet, F., A. C. Muntau, F. G. Debray, A. S. Lotz-Havla, A. Puchwein-Schwepecke *et al.* 2014 Use of sapropterin dihydrochloride in maternal phenylketonuria. A European experience of eight cases. *J.Inherit.Metab Dis.* **37**: 753-762.
- Fiege, B., and N. Blau, 2007 Assessment of tetrahydrobiopterin (BH4) responsiveness in phenylketonuria. *J.Pediatr.* **150**: 627-630.
- Fink, A. L., 1999 Chaperone-mediated protein folding. *Physiol Rev.* **79**: 425-449.
- Fitzpatrick, P. F., 2012 Allosteric regulation of phenylalanine hydroxylase. *Arch.Biochem.Biophys.* **519**: 194-201.
- Fitzpatrick, T. B., and M. Miyamoto, 1957 Competitive inhibition of mammalian tyrosinase by phenylalanine and its relationship to hair pigmentation in phenylketonuria. *Nature* **179**: 199-200.
- Flannery, D. B., E. Hitchcock, and P. Mamunes, 1983 Dietary management of phenylketonuria from birth using a phenylalanine-free product. *J.Pediatr.* **103**: 247-249.
- Flydal, M. I., and A. Martinez, 2013 Phenylalanine hydroxylase: Function, structure, and regulation. *IUBMB.Life* **65**: 341-349.
- Følling A. Über Ausscheidung von Phenylbrenztraubensäure in den Harn als Stoffwechselanomalie in Verbindung mit Imbezillität. 227: 169-176. 1934. *Physiol Chem, Hoppe-Seyler's.*
Ref Type: Generic
- Fusetti, F., H. Erlandsen, T. Flatmark, and R. C. Stevens, 1998 Structure of tetrameric human phenylalanine hydroxylase and its implications for phenylketonuria. *J.Biol.Chem.* **273**: 16962-16967.
- Gassio, R., R. Artuch, M. A. Vilaseca, E. Fuste, C. Boix *et al.* 2005a Cognitive functions in classic phenylketonuria and mild hyperphenylalaninaemia: experience in a paediatric population. *Dev.Med.Child Neurol.* **47**: 443-448.
- Gassio, R., J. Campistol, M. A. Vilaseca, N. Lambruschini, F. J. Cambra *et al.* 2003 Do adult patients with phenylketonuria improve their quality of life after introduction/resumption of a phenylalanine-restricted diet? *Acta Paediatr.* **92**: 1474-1478.

- Gassio, R., E. Fuste, A. Lopez-Sala, R. Artuch, M. A. Vilaseca *et al.* 2005b School performance in early and continuously treated phenylketonuria. *Pediatr.Neurol.* **33**: 267-271.
- Geiger, K. E., D. M. Koeller, C. O. Harding, K. L. Huntington, and M. B. Gillingham, 2016 Normal vitamin D levels and bone mineral density among children with inborn errors of metabolism consuming medical food-based diets. *Nutr.Res.* **36**: 101-108.
- Gersting, S. W., K. F. Kemter, M. Staudigl, D. D. Messing, M. K. Danecka *et al.* 2008 Loss of function in phenylketonuria is caused by impaired molecular motions and conformational instability. *Am.J.Hum.Genet.* **83**: 5-17.
- Gersting, S. W., F. B. Lagler, A. Eichinger, K. F. Kemter, M. K. Danecka *et al.* 2010a Pahenu1 is a mouse model for tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency and promotes analysis of the pharmacological chaperone mechanism in vivo. *Hum.Mol.Genet.* **19**: 2039-2049.
- Gersting, S. W., M. Staudigl, M. S. Truger, D. D. Messing, M. K. Danecka *et al.* 2010b Activation of phenylalanine hydroxylase induces positive cooperativity toward the natural cofactor. *J.Biol.Chem.* **285**: 30686-30697.
- Gokmen, O. H., A. M. Lammardo, K. Motzfeldt, M. Robert, J. C. Rocha *et al.* 2013a Use of sapropterin in the management of phenylketonuria: seven case reports. *Mol.Genet.Metab* **108**: 109-111.
- Gokmen, O. H., A. M. Lammardo, K. Motzfeldt, M. Robert, J. C. Rocha *et al.* 2013b Use of sapropterin in the management of phenylketonuria: seven case reports. *Mol.Genet.Metab* **108**: 109-111.
- Gonzalez, M. J., A. P. Gutierrez, R. Gassio, M. E. Fuste, M. A. Vilaseca *et al.* 2011 Neurological complications and behavioral problems in patients with phenylketonuria in a follow-up unit. *Mol.Genet.Metab* **104 Suppl**: S73-S79.
- Grange, D. K., R. E. Hillman, B. K. Burton, S. Yano, J. Vockley *et al.* 2014 Sapropterin dihydrochloride use in pregnant women with phenylketonuria: an interim report of the PKU MOMS sub-registry. *Mol.Genet.Metab* **112**: 9-16.
- Guest, J. F., J. J. Bai, R. R. Taylor, E. Sladkevicius, P. J. Lee *et al.* 2013 Costs and outcomes over 36 years of patients with phenylketonuria who do and do not remain on a phenylalanine-restricted diet. *J.Intellect.Disabil.Res.* **57**: 567-579.
- Guthrie, R., and A. Susi, 1963 A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations in newborn infants. *Pediatrics* **32**: 338-343.
- Hamman, K., H. Clark, E. Montini, M. Al-Dhalimy, M. Grompe *et al.* 2005 Low therapeutic threshold for hepatocyte replacement in murine phenylketonuria. *Mol.Ther.* **12**: 337-344.
- Hamman, K. J., S. R. Winn, and C. O. Harding, 2011 Hepatocytes from wild-type or heterozygous donors are equally effective in achieving successful therapeutic liver repopulation in murine phenylketonuria (PKU). *Mol.Genet.Metab* **104**: 235-240.
- Harding, C. O., M. B. Gillingham, K. Hamman, H. Clark, E. Goebel-Daghighi *et al.* 2006 Complete correction of hyperphenylalaninemia following liver-directed, recombinant AAV2/8 vector-mediated gene therapy in murine phenylketonuria. *Gene Ther.* **13**: 457-462.

- Harms, E., and B. Olgemöller, 2011 Neonatal screening for metabolic and endocrine disorders. *Dtsch.Arztebl.Int.* **108**: 11-21.
- Hartl, F. U., A. Bracher, and M. Hayer-Hartl, 2011 Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **475**: 324-332.
- Hartl, F. U., and M. Hayer-Hartl, 2002 Molecular chaperones in the cytosol: from nascent chain to folded protein. *Science* **295**: 1852-1858.
- Hawe, A., M. Sutter, and W. Jiskoot, 2008 Extrinsic fluorescent dyes as tools for protein characterization. *Pharm.Res.* **25**: 1487-1499.
- Hegg, E. L., and L. Que, Jr., 1997 The 2-His-1-carboxylate facial triad--an emerging structural motif in mononuclear non-heme iron(II) enzymes. *Eur.J.Biochem.* **250**: 625-629.
- Hufton, S. E., I. G. Jennings, and R. G. Cotton, 1995 Structure and function of the aromatic amino acid hydroxylases. *Biochem.J.* **311 (Pt 2)**: 353-366.
- Ichinose, H., T. Nomura, and C. Sumi-Ichinose, 2008 Metabolism of tetrahydrobiopterin: its relevance in monoaminergic neurons and neurological disorders. *Chem.Rec.* **8**: 378-385.
- Jahja, R., S. C. Huijbregts, L. M. de Sonnevile, J. J. van der Meere, and F. J. van Spronsen, 2014 Neurocognitive evidence for revision of treatment targets and guidelines for phenylketonuria. *J.Pediatr.* **164**: 895-899.
- Jervis, G. A., 1947 Studies on phenylpyruvic oligophrenia; the position of the metabolic error. *J.Biol.Chem.* **169**: 651-656.
- Kaufman, S., W. F. Bridgers, F. EISENBERG, and S. FRIEDMAN, 1962 The source of oxygen in the phenylalanine hydroxylase and the copamine-beta-hydroxylase catalyzed reactions. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* **9**: 497-502.
- Keil, S., K. Anjema, F. J. van Spronsen, N. Lambruschini, A. Burlina *et al.* 2013 Long-term follow-up and outcome of phenylketonuria patients on sapropterin: a retrospective study. *Pediatrics* **131**: e1881-e1888.
- Kleppe, R., and J. Haavik, 2004 Different stabilities and denaturation pathways for structurally related aromatic amino acid hydroxylases. *FEBS Lett.* **565**: 155-159.
- Koch, R., B. Burton, G. Hoganson, R. Peterson, W. Rhead *et al.* 2002 Phenylketonuria in adulthood: a collaborative study. *J.Inherit.Metab Dis.* **25**: 333-346.
- Kure, S., D. C. Hou, T. Ohura, H. Iwamoto, S. Suzuki *et al.* 1999 Tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *J.Pediatr.* **135**: 375-378.
- Lagler, F. B., S. W. Gersting, C. Zsifkovits, A. Steinbacher, A. Eichinger *et al.* 2010 New insights into tetrahydrobiopterin pharmacodynamics from Pah enu1/2, a mouse model for compound heterozygous tetrahydrobiopterin-responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Biochem.Pharmacol.* **80**: 1563-1571.
- Leandro, P., and C. M. Gomes, 2008 Protein misfolding in conformational disorders: rescue of folding defects and chemical chaperoning. *Mini.Rev.Med.Chem.* **8**: 901-911.

- Ledley, F. D., H. E. Grenett, B. S. Dunbar, and S. L. Woo, 1990 Mouse phenylalanine hydroxylase. Homology and divergence from human phenylalanine hydroxylase. *Biochem.J.* **267**: 399-405.
- Lenke, R. R., and H. L. Levy, 1980 Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia. An international survey of the outcome of untreated and treated pregnancies. *N.Engl.J.Med.* **303**: 1202-1208.
- Leuders, S., E. Wolfgart, T. Ott, M. M. du, A. van Teeffelen-Heithoff *et al.* 2014 Influence of PAH Genotype on Sapropterin Response in PKU: Results of a Single-Center Cohort Study. *JIMD.Rep.* **13**: 101-109.
- Levy, H., B. Burton, S. Cederbaum, and C. Scriver, 2007a Recommendations for evaluation of responsiveness to tetrahydrobiopterin (BH(4)) in phenylketonuria and its use in treatment. *Mol.Genet.Metab* **92**: 287-291.
- Levy, H. L., 2012 Congenital heart disease in maternal PKU. *Mol.Genet.Metab* **107**: 648-649.
- Levy, H. L., A. Milanowski, A. Chakrapani, M. Cleary, P. Lee *et al.* 2007b Efficacy of sapropterin dihydrochloride (tetrahydrobiopterin, 6R-BH4) for reduction of phenylalanine concentration in patients with phenylketonuria: a phase III randomised placebo-controlled study. *Lancet* **370**: 504-510.
- Long, P., M. M. May, V. M. James, S. Granno, J. P. Johnson *et al.* 2015 Missense Mutation R338W in ARHGEF9 in a Family with X-linked Intellectual Disability with Variable Macrocephaly and Macro-Orchidism. *Front Mol.Neurosci.* **8**: 83.
- Mabry, C. C., 1990 Phenylketonuria: contemporary screening and diagnosis. *Ann.Clin.Lab Sci.* **20**: 393-397.
- Macdonald, A., A. Chakrapani, C. Hendriksz, A. Daly, P. Davies *et al.* 2006 Protein substitute dosage in PKU: how much do young patients need? *Arch.Dis.Child* **91**: 588-593.
- Macdonald, A., H. Gokmen-Ozel, M. van Rijn, and P. Burgard, 2010 The reality of dietary compliance in the management of phenylketonuria. *J.Inherit.Metab Dis.* **33**: 665-670.
- Macdonald, A., M. Lilburn, B. Cochrane, P. Davies, A. Daly *et al.* 2004 A new, low-volume protein substitute for teenagers and adults with phenylketonuria. *J.Inherit.Metab Dis.* **27**: 127-135.
- Macleod, E. L., and D. M. Ney, 2010 Nutritional Management of Phenylketonuria. *Ann.Nestle.Eng* **68**: 58-69.
- MacLeod, M. D., J. F. Munro, J. G. Ledingham, and J. W. Farquhar, 1983 Management of the extrapyramidal manifestations of phenylketonuria with L-dopa. *Arch.Dis.Child* **58**: 457-458.
- Manti, F., F. Nardecchia, F. Chiarotti, C. Carducci, C. Carducci *et al.* 2016 Psychiatric disorders in adolescent and young adult patients with phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **117**: 12-18.
- Martinez, A., P. M. Knappskog, S. Olafsdottir, A. P. Doskeland, H. G. Eiken *et al.* 1995 Expression of recombinant human phenylalanine hydroxylase as fusion protein in *Escherichia coli* circumvents proteolytic degradation by host cell proteases. Isolation and characterization of the wild-type enzyme. *Biochem.J.* **306 (Pt 2)**: 589-597.

- Martino, T., C. Koerner, G. Yenokyan, J. Hoover-Fong, and A. Hamosh, 2013 Maternal hyperphenylalaninemia: rapid achievement of metabolic control predicts overall control throughout pregnancy. *Mol.Genet.Metab* **109**: 3-8.
- Matalon, R., R. Koch, K. Michals-Matalon, K. Moseley, S. Surendran *et al.* 2004 Biopterin responsive phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet.Med.* **6**: 27-32.
- Matalon, R., K. Michals-Matalon, G. Bhatia, A. B. Burlina, A. P. Burlina *et al.* 2007 Double blind placebo control trial of large neutral amino acids in treatment of PKU: effect on blood phenylalanine. *J.Inherit.Metab Dis.* **30**: 153-158.
- Matulis, D., J. K. Kranz, F. R. Salemme, and M. J. Todd, 2005 Thermodynamic stability of carbonic anhydrase: measurements of binding affinity and stoichiometry using ThermoFluor. *Biochemistry* **44**: 5258-5266.
- Mayrhofer, P., M. Schleef, and W. Jechlinger, 2009 Use of minicircle plasmids for gene therapy. *Methods Mol.Biol.* **542**: 87-104.
- Mitchell, J. J., Y. J. Trakadis, and C. R. Scriver, 2011 Phenylalanine hydroxylase deficiency. *Genet.Med.* **13**: 697-707.
- Modan-Moses, D., I. Vered, G. Schwartz, Y. Anikster, S. Abraham *et al.* 2007 Peak bone mass in patients with phenylketonuria. *J.Inherit.Metab Dis.* **30**: 202-208.
- Moore, B. C., E. S. Magee, and R. M. Siudzinski, 1964 Prevalence of phenylketonuria in an institution for the mentally retarded. *Ariz.Med.* **21**: 715-717.
- Moyle, J. J., A. M. Fox, M. Arthur, M. Bynevelt, and J. R. Burnett, 2007a Meta-analysis of neuropsychological symptoms of adolescents and adults with PKU. *Neuropsychol.Rev.* **17**: 91-101.
- Moyle, J. J., A. M. Fox, M. Bynevelt, M. Arthur, and J. R. Burnett, 2007b A neuropsychological profile of off-diet adults with phenylketonuria. *J.Clin.Exp.Neuropsychol.* **29**: 436-441.
- Muntau A.C., Beblo S. & Koletzko B. Phenylketonurie und Hyperphenylalaninämie. 148: 179–193, 179-193. 2000. Monatsschrift der Kinderheilkunde, S.
Ref Type: Generic
- Muntau, A. C., and S. W. Gersting, 2010 Phenylketonuria as a model for protein misfolding diseases and for the development of next generation orphan drugs for patients with inborn errors of metabolism. *J.Inherit.Metab Dis.* **33**: 649-658.
- Muntau, A. C., J. Leandro, M. Staudigl, F. Mayer, and S. W. Gersting, 2014 Innovative strategies to treat protein misfolding in inborn errors of metabolism: pharmacological chaperones and proteostasis regulators. *J.Inherit.Metab Dis.* **37**: 505-523.
- Muntau, A. C., W. Röschinger, M. Habich, H. Demmelmair, B. Hoffmann *et al.* 2002 Tetrahydrobiopterin as an alternative treatment for mild phenylketonuria. *N.Engl.J.Med.* **347**: 2122-2132.
- Mutze, U., A. Roth, J. F. Weigel, S. Beblo, C. G. Baerwald *et al.* 2011a Transition of young adults with phenylketonuria from pediatric to adult care. *J.Inherit.Metab Dis.* **34**: 701-709.

- Mutze, U., A. Roth, J. F. Weigel, S. Beblo, C. G. Baerwald *et al.* 2011b Transition of young adults with phenylketonuria from pediatric to adult care. *J.Inherit.Metab Dis.* **34**: 701-709.
- Nelson DL & Cox MN. *Lehninger Principles of Biochemistry*. 6. 2013. Macmillan Higher Education.
Ref Type: Generic
- Nennstiel-Ratzel, U., G. Holscher, P. Ehrensperger-Reeh, R. von Kries, and M. Wildner, 2010 Prevention of Sudden Infant Death Syndrome (SIDS) in Bavaria - evaluation of a prevention campaign. *Klin.Padiatr.* **222**: 45-50.
- Ney, D. M., R. D. Blank, and K. E. Hansen, 2014 Advances in the nutritional and pharmacological management of phenylketonuria. *Curr.Opin.Clin.Nutr.Metab Care* **17**: 61-68.
- Opladen, T., S. B. Abu, A. Rassi, B. Thöny, G. F. Hoffmann *et al.* 2011 Diagnosis of tetrahydrobiopterin deficiency using filter paper blood spots: further development of the method and 5 years experience. *J.Inherit.Metab Dis.* **34**: 819-826.
- Pearson, K. D., A. D. Gean-Marton, H. L. Levy, and K. R. Davis, 1990 Phenylketonuria: MR imaging of the brain with clinical correlation. *Radiology* **177**: 437-440.
- Perez, B., L. R. Desviat, P. Gomez-Puertas, A. Martinez, R. C. Stevens *et al.* 2005 Kinetic and stability analysis of PKU mutations identified in BH4-responsive patients. *Mol.Genet.Metab* **86 Suppl 1**: S11-S16.
- Perri, E. R., C. J. Thomas, S. Parakh, D. M. Spencer, and J. D. Atkin, 2015 The Unfolded Protein Response and the Role of Protein Disulfide Isomerase in Neurodegeneration. *Front Cell Dev.Biol.* **3**: 80.
- Pey, A. L., B. Perez, L. R. Desviat, M. A. Martinez, C. Aguado *et al.* 2004a Mechanisms underlying responsiveness to tetrahydrobiopterin in mild phenylketonuria mutations. *Hum.Mutat.* **24**: 388-399.
- Pey, A. L., M. Thorolfsson, K. Teigen, M. Ugarte, and A. Martinez, 2004b Thermodynamic characterization of the binding of tetrahydropterins to phenylalanine hydroxylase. *J.Am.Chem.Soc.* **126**: 13670-13678.
- Pey, A. L., M. Ying, N. Cremades, A. Velazquez-Campoy, T. Scherer *et al.* 2008a Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J.Clin.Invest* **118**: 2858-2867.
- Pey, A. L., M. Ying, N. Cremades, A. Velazquez-Campoy, T. Scherer *et al.* 2008b Identification of pharmacological chaperones as potential therapeutic agents to treat phenylketonuria. *J.Clin.Invest* **118**: 2858-2867.
- Pietz, J., R. Dunkelmann, A. Rupp, D. Rating, H. M. Meinck *et al.* 1998 Neurological outcome in adult patients with early-treated phenylketonuria. *Eur.J.Pediatr.* **157**: 824-830.
- Pietz, J., R. Kreis, A. Rupp, E. Mayatepek, D. Rating *et al.* 1999 Large neutral amino acids block phenylalanine transport into brain tissue in patients with phenylketonuria. *J.Clin.Invest* **103**: 1169-1178.

- Porta, F., A. Mussa, A. Zanin, N. A. Greggio, A. Burlina *et al.* 2011 Impact of metabolic control on bone quality in phenylketonuria and mild hyperphenylalaninemia. *J.Pediatr.Gastroenterol.Nutr.* **52**: 345-350.
- Poser, C. M., and L. van Bogaert, 1959 Neuro-pathologic observations in phenylketonuria. *Brain* **82**: 1-9.
- Potocnik, U., and K. Widhalm, 1994 Long-term follow-up of children with classical phenylketonuria after diet discontinuation: a review. *J.Am.Coll.Nutr.* **13**: 232-236.
- Prick, B. W., W. C. Hop, and J. J. Duvekot, 2012 Maternal phenylketonuria and hyperphenylalaninemia in pregnancy: pregnancy complications and neonatal sequelae in untreated and treated pregnancies. *Am.J.Clin.Nutr.* **95**: 374-382.
- Rebuffat, A., C. O. Harding, Z. Ding, and B. Thöny, 2010 Comparison of adeno-associated virus pseudotype 1, 2, and 8 vectors administered by intramuscular injection in the treatment of murine phenylketonuria. *Hum.Gene Ther.* **21**: 463-477.
- Sahai, I., and D. Marsden, 2009 Newborn screening. *Crit Rev.Clin.Lab Sci.* **46**: 55-82.
- Sahni, N., S. Yi, M. Taipale, J. I. Fuxman Bass, J. Coulombe-Huntington *et al.* 2015 Widespread macromolecular interaction perturbations in human genetic disorders. *Cell* **161**: 647-660.
- Sanford, M., and G. M. Keating, 2009 Sapropterin: a review of its use in the treatment of primary hyperphenylalaninaemia. *Drugs* **69**: 461-476.
- Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson, 1977 DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A* **74**: 5463-5467.
- Sarkissian, C. N., T. S. Kang, A. Gamez, C. R. Scriver, and R. C. Stevens, 2011 Evaluation of orally administered PEGylated phenylalanine ammonia lyase in mice for the treatment of Phenylketonuria. *Mol.Genet.Metab* **104**: 249-254.
- Schindeler, S., S. Ghosh-Jerath, S. Thompson, A. Rocca, P. Joy *et al.* 2007 The effects of large neutral amino acid supplements in PKU: an MRS and neuropsychological study. *Mol.Genet.Metab* **91**: 48-54.
- Schuck, P. F., F. Malgarin, J. H. Cararo, F. Cardoso, E. L. Streck *et al.* 2015 Phenylketonuria Pathophysiology: on the Role of Metabolic Alterations. *Aging Dis.* **6**: 390-399.
- Scriver, C. R., S. Kaufman, and S. L. Woo, 1988 Mendelian hyperphenylalaninemia. *Annu.Rev.Genet.* **22**: 301-321.
- Sharman, R., K. Sullivan, R. M. Young, and J. McGill, 2012 Depressive symptoms in adolescents with early and continuously treated phenylketonuria: associations with phenylalanine and tyrosine levels. *Gene* **504**: 288-291.
- Shen, N., C. Heintz, C. Thiel, J. G. Okun, G. F. Hoffmann *et al.* 2016 Co-expression of phenylalanine hydroxylase variants and effects of interallelic complementation on in vitro enzyme activity and genotype-phenotype correlation. *Mol.Genet.Metab* **117**: 328-335.
- Shiman, R., D. W. Gray, and M. A. Hill, 1994a Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. I. Kinetic properties of the enzyme's iron and enzyme reduction site. *J.Biol.Chem.* **269**: 24637-24646.

- Shiman, R., T. Xia, M. A. Hill, and D. W. Gray, 1994b Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. II. Substrate binding and the role of activation in the control of enzymatic activity. *J.Biol.Chem.* **269**: 24647-24656.
- Smith, I., and J. Knowles, 2000 Behaviour in early treated phenylketonuria: a systematic review. *Eur.J.Pediatr.* **159 Suppl 2**: S89-S93.
- Smith, I., and O. H. Wolff, 1974 Natural history of phenylketonuria and influence of early treatment. *Lancet* **2**: 540-544.
- Solstad, T., A. J. Stokka, O. A. Andersen, and T. Flatmark, 2003 Studies on the regulatory properties of the pterin cofactor and dopamine bound at the active site of human phenylalanine hydroxylase. *Eur.J.Biochem.* **270**: 981-990.
- Staudigl, M., S. W. Gersting, M. K. Danecka, D. D. Messing, M. Woidy *et al.* 2011 The interplay between genotype, metabolic state and cofactor treatment governs phenylalanine hydroxylase function and drug response. *Hum.Mol.Genet.* **20**: 2628-2641.
- Stokka, A. J., R. N. Carvalho, J. F. Barroso, and T. Flatmark, 2004 Probing the role of crystallographically defined/predicted hinge-bending regions in the substrate-induced global conformational transition and catalytic activation of human phenylalanine hydroxylase by single-site mutagenesis. *J.Biol.Chem.* **279**: 26571-26580.
- Stokka, A. J., and T. Flatmark, 2003 Substrate-induced conformational transition in human phenylalanine hydroxylase as studied by surface plasmon resonance analyses: the effect of terminal deletions, substrate analogues and phosphorylation. *Biochem.J.* **369**: 509-518.
- Sullivan, J. E., and P. Chang, 1999 Review: emotional and behavioral functioning in phenylketonuria. *J.Pediatr.Psychol.* **24**: 281-299.
- Ten Hoedt, A. E., L. M. de Sonnevile, B. Francois, N. M. Ter Horst, M. C. Janssen *et al.* 2011 High phenylalanine levels directly affect mood and sustained attention in adults with phenylketonuria: a randomised, double-blind, placebo-controlled, crossover trial. *J.Inherit.Metab Dis.* **34**: 165-171.
- Thiele, A. G., C. Rohde, U. Mütze, M. Arelin, U. Ceglarek *et al.* 2015 The challenge of long-term tetrahydrobiopterin (BH4) therapy in phenylketonuria: Effects on metabolic control, nutritional habits and nutrient supply. *Mol.Genet.Metab Rep.* **4**: 62-67.
- Thompson, A. J., S. Tillotson, I. Smith, B. Kendall, S. G. Moore *et al.* 1993 Brain MRI changes in phenylketonuria. Associations with dietary status. *Brain* **116 (Pt 4)**: 811-821.
- Thöny, B., Z. Ding, and A. Martinez, 2004 Tetrahydrobiopterin protects phenylalanine hydroxylase activity in vivo: implications for tetrahydrobiopterin-responsive hyperphenylalaninemia. *FEBS Lett.* **577**: 507-511.
- Thorolfsson, M., B. Ibarra-Molero, P. Fojan, S. B. Petersen, J. M. Sanchez-Ruiz *et al.* 2002 L-phenylalanine binding and domain organization in human phenylalanine hydroxylase: a differential scanning calorimetry study. *Biochemistry* **41**: 7573-7585.
- Trefz, F. K., B. K. Burton, N. Longo, M. M. Casanova, D. J. Gruskin *et al.* 2009 Efficacy of sapropterin dihydrochloride in increasing phenylalanine tolerance in children with phenylketonuria: a phase III, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *J.Pediatr.* **154**: 700-707.

- Trefz, F. K., A. C. Muntau, F. B. Lagler, F. Moreau, J. Alm *et al.* 2015 The Kuvan((R)) Adult Maternal Paediatric European Registry (KAMPER) Multinational Observational Study: Baseline and 1-Year Data in Phenylketonuria Patients Responsive to Sapropterin. *JIMD.Rep.* **23**: 35-43.
- Underhaug, J., O. Aubi, and A. Martinez, 2012 Phenylalanine hydroxylase misfolding and pharmacological chaperones. *Curr.Top.Med.Chem.* **12**: 2534-2545.
- Vajro, P., P. Strisciuglio, D. Houssin, G. Huault, J. Laurent *et al.* 1993 Correction of phenylketonuria after liver transplantation in a child with cirrhosis. *N.Engl.J.Med.* **329**: 363.
- van Calcar, S. C., and D. M. Ney, 2012 Food products made with glycomacropeptide, a low-phenylalanine whey protein, provide a new alternative to amino Acid-based medical foods for nutrition management of phenylketonuria. *J.Acad.Nutr.Diet.* **112**: 1201-1210.
- van Spronsen, F. J., M. J. de Groot, M. Hoeksma, D. J. Reijngoud, and M. van Rijn, 2010 Large neutral amino acids in the treatment of PKU: from theory to practice. *J.Inherit.Metab Dis.* **33**: 671-676.
- Vockley, J., H. C. Andersson, K. M. Antshel, N. E. Braverman, B. K. Burton *et al.* 2014 Phenylalanine hydroxylase deficiency: diagnosis and management guideline. *Genet.Med.* **16**: 188-200.
- Waisbren, S. E., K. Noel, K. Fahrbach, C. Cella, D. Frame *et al.* 2007 Phenylalanine blood levels and clinical outcomes in phenylketonuria: a systematic literature review and meta-analysis. *Mol.Genet.Metab* **92**: 63-70.
- Walter, J. H., and F. J. White, 2004 Blood phenylalanine control in adolescents with phenylketonuria. *Int.J.Adolesc.Med.Health* **16**: 41-45.
- Walter, J. H., F. J. White, S. K. Hall, A. MacDonald, G. Rylance *et al.* 2002 How practical are recommendations for dietary control in phenylketonuria? *Lancet* **360**: 55-57.
- Waters, P. J., 2001 Degradation of mutant proteins, underlying "loss of function" phenotypes, plays a major role in genetic disease. *Curr.Issues Mol.Biol.* **3**: 57-65.
- Weglage, J., D. Wiedermann, J. Denecke, R. Feldmann, H. G. Koch *et al.* 2001 Individual blood-brain barrier phenylalanine transport determines clinical outcome in phenylketonuria. *Ann.Neurol.* **50**: 463-467.
- Werner, E. R., N. Blau, and B. Thöny, 2011 Tetrahydrobiopterin: biochemistry and pathophysiology. *Biochem.J.* **438**: 397-414.
- Woolf, L. I., and D. G. Vulliamy, 1951 Phenylketonuria with a study of the effect upon it of glutamic acid. *Arch.Dis.Child* **26**: 487-494.
- Xia, T., D. W. Gray, and R. Shiman, 1994 Regulation of rat liver phenylalanine hydroxylase. III. Control of catalysis by (6R)-tetrahydrobiopterin and phenylalanine. *J.Biol.Chem.* **269**: 24657-24665.
- Yagi, H., T. Ogura, H. Mizukami, M. Urabe, H. Hamada *et al.* 2011 Complete restoration of phenylalanine oxidation in phenylketonuria mouse by a self-complementary adeno-associated virus vector. *J.Gene Med.* **13**: 114-122.

- Zhang, N., Y. Tsybovsky, A. V. Kolesnikov, M. Rozanowska, M. Swider *et al.* 2015 Protein misfolding and the pathogenesis of ABCA4-associated retinal degenerations. *Hum.Mol.Genet.* **24**: 3220-3237.
- Ziesch, B., J. Weigel, A. Thiele, U. Mütze, C. Rohde *et al.* 2012 Tetrahydrobiopterin (BH4) in PKU: effect on dietary treatment, metabolic control, and quality of life. *J.Inherit.Metab Dis.* **35**: 983-992.
- Zschocke, J., 2003 Phenylketonuria mutations in Europe. *Hum.Mutat.* **21**: 345-356.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
6-MPH₄	6-Methyltetrahydropterin
AAV8	Adenoassoziierter Virus Serotyp 8
ANS	8-anilino-1-naphtalensulfonsäure
a.u.	Absorbance unit
BH₂	Dihydrobiopterin
BH₄	Tetrahydrobiopterin
C	Celsius
CH	Schweiz
D	Deutschland
DHPR	Dihydropteridin-Reduktase
DNA	Desoxiribonukleinsäure
DSF	Differential Scanning Fluorimetry
DTT	1,4-Dithiothreitol
E.coli	Escherichia coli.
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FDA	Food and Drug Administration
Fe	Eisen
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
HPA	Hyperphenylalaninämie
IQ	Intelligenzquotient
K	Kelvin
kb	Kilobase
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
kJ	Kilojoule
LB	Lysogeny Broth
ln	Natürlicher Logarithmus
Min	Minute
mg	Milligramm
ml	Milliliter
Mm-PAH	Murine Phenylalaninhydroxylase
MRT	Magnetresonanztomographie
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid

PAH	Phenylalaninhydroxylase
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG-PAL	Polyethylenglykol-konjugierte Phenylalanin-Ammoniak-Lyase
Phe	Phenylalanin
PKU	Phenylketonurie
RALS	Right-Angle-Light Scattering
RNA	Ribonukleinsäure
SOC	Superoptimales Medium mit Katabolitensuppression
SP	Sepiapterin
SPZ	Sozialpädiatrisches Zentrum
T	Temperatur
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-gepuffertes Natriumsalz
TE	Tromethamin mit Ethylendiamintetraessigsäure
T_m	Übergangstemperatur
TRIS	Tromethamin
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
Wt	Wildtyp
µl	Mikroliter
µM	Mikromol

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen Personen bedanken, die mich während meines Studiums und der Erstellung meiner Promotionsarbeit unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein herzlicher Dank Frau Prof. Dr. med. Ania C. Muntau für die Überlassung des Themas und insbesondere für die ausdauernde, immer freundliche und sehr lehrreiche Betreuung in unserer Arbeitsgruppe, die sie so familiär geprägt hat. Ich danke ihr für die Einführung in das spannende Gebiet der angeborenen Stoffwechselerkrankungen, dem sie sich mit so viel Energie, Kraft, Wissen und einem mitreißenden Enthusiasmus widmet. Zudem möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. med. Søren W. Gersting danken, der mich in vielen lebhaften Diskussionen immer wieder zum Nachdenken und Umdenken gebracht hat. Durch seine zahlreichen Ideen wurde die Arbeit so facettenreich wie sie es jetzt ist. Ihnen beiden möchte ich für die Möglichkeit danken, ein Teil ihrer wunderbaren Arbeitsgruppe sein zu dürfen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Frau Dipl. Chem. Dunja D. Reiß, ohne deren Hilfe die Erstellung der Arbeit kaum möglich gewesen wäre. Sie hat mir nicht nur in geduldigen Erklärungen die Komplexität der Proteinfaltung näher gebracht, sondern mich in jeder Hinsicht tatkräftig und ausdauernd unterstützt. Sie hat die besondere Gabe, in allem das Gute zu sehen und hat mich dadurch immer wieder motiviert. Darüber hinaus möchte ich meiner Mitdoktorandin Johanna Jank danken, die ich in der Arbeitsgruppe kennen lernen durfte und die mir in den Jahren zur besten Freundin geworden ist.

Natürlich möchte ich mich auch bei allen weiteren aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe bedanken, insbesondere bei Marta Danecka, Anna Eichinger, Anja Schultze, Heike Preißler, Kristina Kempter, Esther Maier, Michael Staudigl, Mathias Woidy, Anna Heckel-Pompey, Julian Klingbeil, Amelie Lotz-Havla, Uli Schatz und Julia Borsch. Ich danke ihnen für die wunderbare und kollegiale Unterstützung zu jeder Tages- und Nachtzeit, für die anregenden Ratschläge und stete Motivation, aber auch für die vielen schönen Stunden, die die Arbeit zu etwas einzigartigem gemacht haben.

Hiermit möchte ich meinen Freundinnen Evi und Katrina danken, die mich nicht aufgegeben haben, obwohl ich sie wegen der Arbeit häufig vernachlässigt habe. Zudem gilt mein besonderer Dank auch meinem Bruder Christopher und meinen Schwiegereltern Marlene und Edmund, die mich mit neckenden bzw. liebevollen Worten immer unterstützt haben.

Nicht zuletzt möchte ich meinem Ehemann Tobias danken, der immer an mich geglaubt und mir Kraft und Zuversicht gegeben hat. Er ist seit 10 Jahren der beste Teil meines Lebens.

Mein größter Dank gebührt meinen Eltern Barbara und Horst Domdey für die vielen angeregten Diskussionen, die kritischen Hinterfragungen, die Versorgung mit Naturalien an stressigen Tagen und die verständnisvollen Worte zur rechten Zeit. Sie haben mir mein Studium und die Arbeit im Labor ermöglicht und mich immer bedingungslos unterstützt.

Eidesstattliche Versicherung

Schiergens, Katharina

Name, Vorname

Ich erkläre hiermit an Eides statt,

dass ich die vorliegende Dissertation mit dem Thema

**Der Wirkmechanismus des natürlichen Kofaktors Tetrahydrobiopterin als
pharmakologisches Chaperon bei der Behandlung der Phenylketonurie**

selbständig verfasst, mich außer der angegebenen keiner weiteren Hilfsmittel bedient und alle Erkenntnisse, die aus dem Schrifttum ganz oder annähernd übernommen sind, als solche kenntlich gemacht und nach ihrer Herkunft unter Bezeichnung der Fundstelle einzeln nachgewiesen habe.

Ich erkläre des Weiteren, dass die hier vorgelegte Dissertation nicht in gleicher oder in ähnlicher Form bei einer anderen Stelle zur Erlangung eines akademischen Grades eingereicht wurde.

München, 04.05.2017

Ort, Datum

Unterschrift Doktorandin/Doktorand